

代謝物の構造解析と反応性代謝物生成評価に関する研究

著者	井上 和子
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9205号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58778

代謝物の構造解析と反応性代謝物生成 評価に関する研究

井上 和子

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. A Trapping Method for Semi-quantitative Assessment of Reactive Metabolite Formation Using [³⁵S]Cysteine and [¹⁴C]Cyanide.
Kazuko Inoue, Yoshihiro Shibata, Hiroyuki Takahashi, Tomoyuki Ohe, Masato Chiba and Yasuyuki Ishii
Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 24 (2009) 245-254.
2. Aromatic Substitution Reaction of 2-Chloropyridines Catalyzed by Microsomal Glutathione *S*-Transferase 1.
Kazuko Inoue, Tomoyuki Ohe, Kenichi Mori, Takeshi Sagara, Yasuyuki Ishii and Masato Chiba
Drug Metabolism and Disposition, 37 (2009) 1797-1800.
3. Unique Metabolic Pathway of [¹⁴C]Lenvatinib after Oral Administration to Male Cynomolgus Monkey.
Kazuko Inoue, Naoki Asai, Hitoshi Mizuo, Katsuyuki Fukuda, Kazutomi Kusano and Tsutomu Yoshimura
Drug Metabolism and Disposition, 40 (2012) 662-670.

目次

緒言	6
第一章 精密質量分析計及びNMRを用いた lenvatinib の新規代謝物およびその生成経路の解明	9
第一節 序	9
第二節 精密質量分析計によるサルへの $[^{14}\text{C}]$ lenvatinib 経口投与後の代謝物分析	9
第三節 NMR による C1、C3 及び C4 の構造同定	19
第四節 代謝物 C2 (GSH 付加体) 生成における酵素の寄与	22
第五節 Lenvatinib の代謝物生成機構の解明	23
第六節 結果の考察	26
第二章 計算化学的手法を用いた microsomal glutathione <i>S</i> -transferase による 2-chloropyridine 誘導体への芳香族求核置換反応機構の解明	31
第一節 序	31
第二節 新規 2-glutathionyl-3-nitropyridine の精密質量分析計による構造解析	31
第三節 GST 依存的な 2-glutathionyl-3-nitropyridine の生成	32
第四節 求核置換反応における置換基と位置の効果	33
第五節 分子軌道計算と推定反応メカニズム	36
第六節 結果の考察	37
第三章 $[^{35}\text{S}]$ Cysteine 及び $[^{14}\text{C}]$ cyanide を用いた反応性代謝物のトラッピング法の確立	41
第一節 序	41
第二節 $[^{35}\text{S}]$ Cysteine 付加体の radio-LC/MS による構造推定	43
第三節 共有結合試験と $[^{35}\text{S}]$ cysteine/ $[^{14}\text{C}]$ cyanide トラッピング試験の関係	48
第四節 結果の考察	50

結語	54
謝辞	58
実験の部	59
引用文献	70

略号表

本論文では、以下の略号を用いることがある。

AUC: Area under the Curve

CID: Collision-Induced Dissociation

COSY: Correlation Spectroscopy

CYP: Cytochrome P450

DP: Dipeptidase

FDA: Food and Drug Administration

GSH: Glutathione

GST: Glutathione *S*-Transferase

γ -GTP: γ -Glutamyl Transpeptidase

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ICH: International Conference on Harmonization

LC: Liquid Chromatography

MDF: Mass Defect Filtering

MIST: Metabolite in Safety Testing

MS: Mass Spectrometer

Nac: *N*-Acetyl Cysteine

NATs: *N*-Acetyltransferases

NMR: Nuclear Magnetic Resonance

NOE : Nuclear Overhauser Effect

NOESY: NOE Spectroscopy

UDPGT: Uridine Diphosphate Glucuronosyltransferase

UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

緒言

一般に、薬物は体内で種々の薬物代謝酵素により親水性の高い代謝物に変換され体外に排泄されるが、代謝物によっては薬理活性や毒性を示す場合もあるため、医薬品開発の過程で、代謝物の薬効や安全性を適切に評価する必要がある。例えば、FDA の MIST (Metabolite in safety testing) ガイダンス¹⁾や ICH (International conference on harmonization) の M3 ガイドライン²⁾では、ヒトで検出された代謝物の AUC が、投与薬物に由来する全物質の AUC の 10%を越えるもので、動物を用いた安全性試験で十分な暴露が確保できなかった場合、大規模臨床試験 (Phase 3 試験) の前までに当該代謝物に関する種々の毒性試験の実施を要求している。そのため、臨床開発の早い段階からヒトの代謝物プロファイルを正確に把握し、毒性評価動物との相関を明確にしておくことが重要である。最近では、構造解析技術の発展により、臨床第 1 相試験 (Phase 1 試験) の段階でヒトの血漿や尿などに含まれる代謝物の情報を正確に得ることが可能になりつつある。一方、近年の薬物動態スクリーニング系の整備に伴い、代謝されにくい低投与量の薬剤開発が主流になっており、生成する代謝物も微量となるため、定量及び定性の両面で高感度な分析技術が要求される。とりわけ、医薬品開発の初期段階における代謝物の検索では、未変化体の構造をプローブにして複雑なマトリクスから代謝物を見つける必要があり、こうした目的の達成には精密質量分析計の活用がきわめて有利となる。

精密質量分析計は物質の質量を 10 ppm 以内の精度で解析できるため、より高い確度で微量な代謝物を検索可能である。これに加え、酸化や抱合反応といった薬物代謝に伴う質量の小数点以下の変化 (mass defect) を利用した mass defect filtering (MDF) と呼ばれる手法を用いることで、雑多な生体成分中の代謝物を高い確度で検索することができる。そこで、本研究でも、精密質量分析計によって得られたデータを MDF で処理することによって、未変化体由来の代謝物を確度よく探索し、臨床開発中の lenvatinib の複雑な代謝の全容を明らかにすることを目的とした。

精密質量分析計のハード及びソフト面の発展に伴って、多くの代謝物の解析が容易になったが、化学的に不安定な代謝物の構造推定は依然として難しい。例えば、芳香環の代謝により生成するエポキシドは、タンパク質のアミノ酸残基と共有結合を形成しやすいため、代謝物として検出されることはほとんどない。化学的に不安定な代謝物を生成する反応過程は代謝的活性化と呼ばれ、エポキシドのような代謝物は反応性代謝物と呼ばれる。反応性代謝物は求電子性で、求核性の官能基を有するタンパク質や核酸と反応し、代謝物の付加体を生ずることが多い。核酸との共有結合性は変異原性の直接的な原因になり得るため、遺伝毒性試験の一つとして古くから行われている Ames 試験でそのリスク評価が行われている。一方、反応性代謝物は、cytochrome P450 (CYP) や UDP-glucuronosyl transferase (UDPGT) などの当該反応性代謝物の生成に関与する酵素自身に結合して、それらを不活化するため、薬物間相互作用の観点からも研究されている^{3,4)}。さらに、最近では反応性代謝物が生産に関わった酵素のみならず、他のタンパク質にも結合して、時に重篤な副作用を起こすことが示され、上市済医薬品の市場撤退や開発中止を余儀なくされる場合もある。例えば、2 型糖尿病薬として上市された troglitazone は、重篤な肝障害（劇症肝炎）により上市後間もなく市場から撤退しており、その原因の一つに反応性代謝物の関与が示唆されている。反応性代謝物が原因と疑われる毒性の多くは、前臨床試験で確認することが困難で、用量依存性もないばかりか、副作用が重篤化することもあり、これらは一般にヒト特異体質性の毒性（Idiosyncratic toxicity）と呼ばれている⁵⁾。劇症肝炎やスティーブンス・ジョンソン症候群など、生命を脅かすほどの重篤な毒性を避けるためには、反応性代謝物の生成リスクを限りなく抑える必要がある。そこで、本研究では、構造の最適化が可能な創薬初期段階において、反応性代謝物の生成リスクを定量・定性の両面からの確に把握することを目的として、計算法的手法と反応性代謝物の捕捉・定量/定性法を種々検討し、構造最適化に有効な情報取得や新規リスクアセスメント法を開発することとした。

以上のような本研究の目的を達成するために、第一章では、抗がん薬として開発中の lenvatinib をサルに経口投与したときに検出された、芳香族求核置換反応に関わる複雑な代

代謝物について、精密質量分析計及び核磁気共鳴装置（NMR）を用いて構造解析した。次いで、当該代謝物生成機構を解明するとともに、サルならびにヒトにおける lenvatinib 代謝の全容を明らかにした。

第二章では、ピリジン環において新規芳香族求核置換反応が認められた 2-chloropyridine 誘導体を用いて、microsomal glutathione *S*-transferase によるグルタチオン（GSH）の抱合代謝活性を測定し、その結果を計算化学的手法により解析することで、本代謝反応の構造活性相関から、求電子性に影響を与える構造的因子について新たな知見を得た。

第三章では、多種多様な反応性代謝物を一元的に定量・定性分析する方法の構築を企図し、放射性同位元素を標識した求核剤によるトラッピング法を開発した。開発に当たっては、2 種類のトラップ剤（求核剤）を併用することで従来法の欠点を克服し、反応性代謝物による毒性発現に対する有益な新規リスク評価法を開発することに成功した。

以上の結果、得られた新しい知見を以下に述べる。

第一章 精密質量分析計及びNMRを用いた lenvatinib の新規代謝物およびその生成経路の解明

第一節 序

Lenvatinib は、ユニークな受容体型チロシンキナーゼの阻害活性を基に、血管新生抑制ならびに腫瘍成長抑制の両面から作用する経口分子標的薬として臨床開発中の抗がん薬である。本薬物は、vascular endothelial growth factor (VEGF) の強力な阻害作用を有し、ヒトがん xenograft モデルにおいて、広範な抗がんスペクトルを示すことが確認されている。VEGF は multiple tyrosine kinase であり、転移がんを含むがん巣での血管新生を促進し、がんの成長に寄与している^{11,13,14,15}。そのため、lenvatinib のような VEGF の阻害薬は、様々ながん種において抗がん活性を示すと期待されている。

Lenvatinib は、抗がん活性に重要なクロロフェノキシキノリン構造を含む。本薬物をサル肝ミクロソーム画分とインキュベーションすると、主要な代謝物としてキノリン部分の *N*-oxide 体、メトキシ基の脱メチル体、及びキノリノール体が生成する。しかし、本薬物をサルに経口投与すると、in vitro で検出した上記の酸化代謝物はむしろマイナーであり、多くの未知代謝物が検出された。

そこで第一章では、サルに経口投与したときに検出された lenvatinib の未知代謝物について、精密質量分析計と NMR を用いて分析し、代謝経路と反応機構を解明した。

第二節 精密質量分析計によるサルへの [¹⁴C]lenvatinib 経口投与後の代謝物分析

サルに lenvatinib を投与したときに生成した未知代謝物の構造を明らかにするため、¹⁴C で標識した lenvatinib ([¹⁴C]lenvatinib mesylate, Figure 1) を、30 mg/kg (12.7 MBq/kg) の用量で雄性サル (Cynomolgus monkey) に経口投与し、尿、糞、血漿、胆嚢胆汁及び肝臓を採

取した。

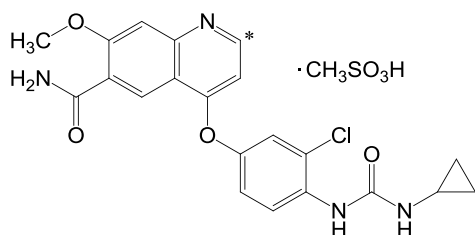


Figure 1 Chemical structure of [^{14}C]lenvatinib mesylate

*: ^{14}C -labeled position

尿及び胆嚢胆汁中の放射活性成分、ならびに肝臓ホモジネートや血漿試料からメタノールで抽出した放射活性成分のラジオクロマトグラムを Figure 2 に示す。血漿中には未変化体 (C7) のみが検出されたが、その他の試料では合計 6 種類の未知代謝物が検出された。検出された 6 種の代謝物は、保持時間の順に C1 から C6 とした。なお、糞中の主要成分のほとんどは未変化体であったため、ラジオクロマトグラムは割愛した。放射活性成分として、投与後 3 日目までに、尿中に 19%、糞中に 59%を回収しており、胆汁への未変化体排泄も少ないことから、糞中では高投与量のため経口投与後の未吸収画分が多かったと推測された。

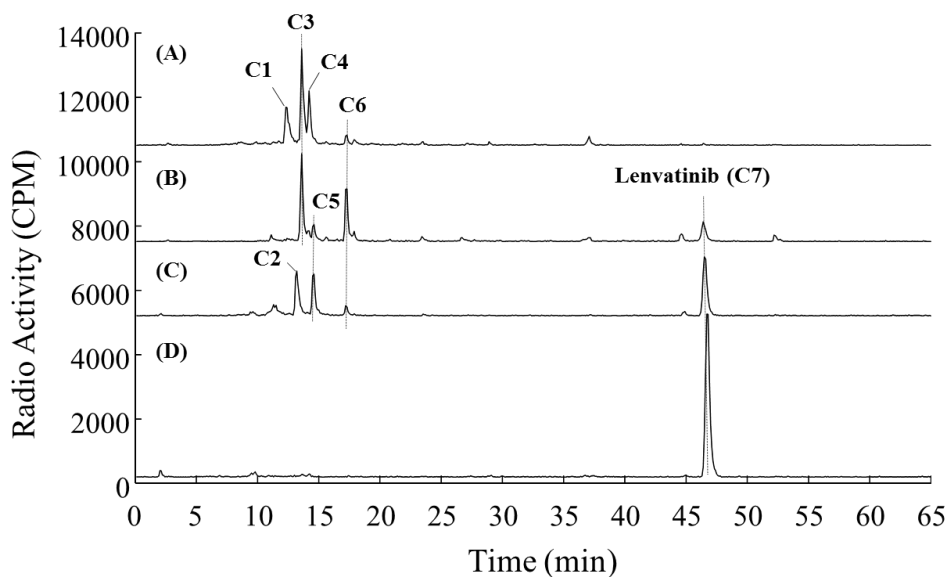


Figure 2 Radiochromatograms of radioactive components in monkey samples

(A): urine, (B): bile in gall bladder, (C): liver, and (D): plasma.

次いで、精密質量分析計を用いて LC/MS 分析し、代謝物及び未変化体の精密質量を測定した (Table 1)。代謝物由来のイオンの組成式を未変化体のそれと比較した結果、C1 から C6 の全ての代謝物において新たに硫黄原子が付加されていることが明らかとなった。また、いずれの代謝物も未変化体由来の塩素原子を含まないことから、クロロフェノキシ部分になんらかの構造変化があったものと考えられた。

精密質量分析計を用いることにより、未変化体と代謝物の精密質量を比較したときの mass defect から代謝経路を推測できる。例えば、肝ミクロソームにおける第一相代謝を考えた場合、予想される代謝経路は酸化、還元あるいは加水分解であり、酸化 (+O, +15.9949 Da) の場合、未変化体への酸素原子の付加により変化する整数部分の変化は 16 Da だが、mass defect は-5.1 mDa となる (Table 2)。

Table 1 Summary of seven radioactive components after oral administration of [^{14}C]lenvatinib to male cynomolgus monkey at 30 mg/kg

ID	Rt ^a (min)	Proposed Formula	Calculated	Observed	Error (ppm)	Product Ion (s) (m/z)	Bile	Urine	Plasma	Liver
			[M+H] ⁺	[M + H] ⁺						
			(m/z)	(m/z)						
C1	12.2	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₄ S ⁺	293.0591	293.0593	0.7	234, 216, 161	-	Y	-	-
C2	13.1	C ₂₁ H ₂₆ N ₅ O ₈ S ⁺	508.1497	508.1501	0.8	379, 235, 218	-	-	-	Y
C3	13.5	C ₂₈ H ₂₉ N ₆ O ₈ S ₂ ⁺	641.1483	641.1496	2.0	354, 288, 244	Y	Y	-	-
C4	14.1	C ₃₀ H ₃₂ N ₇ O ₉ S ₂ ⁺	698.1697	698.1694	0.4	411, 244	-	Y	-	-
C5	14.5	C ₁₄ H ₁₆ N ₃ O ₄ S ⁺	322.0856	322.0864	2.5	276, 244, 218	Y	-	-	Y
C6	17.1	C ₂₅ H ₂₄ N ₅ O ₆ S ⁺	522.1442	522.1436	1.1	505, 244	Y	Y	-	Y
C7	46.4	C ₂₁ H ₂₀ ClN ₄ O ₄ ⁺	427.1168	427.1169	0.2	370, 353, 327	Y	-	Y	Y

^a: Retention time.

Y: Detected radioactive component.

Table 2 Mass defect in phase I metabolism

第 1 相代謝反応	組成式変化	質量変化 (Da)	整数質量変化 (Da)	小数点以下の 質量変化 (mass defect) (mDa)
脱プロピル化	-C ₃ H ₆	-42.0468	-42	-46.8
脱エチル	-C ₂ H ₄	-28.0312	-28	-31.2
脱メチル	-CH ₂	-14.0157	-14	-15.7
還元	-2H	-2.0157	-2	-15.7
酸化	+O	15.9949	16	-5.1
二酸化	+2O	31.9898	32	-10.2
カルボニル化	+O-2H	13.9792	14	-20.8
カルボキシ化	+2O-2H	29.9741	30	-25.9

一方、抱合が主要な代謝経路である第二相代謝の GSH 抱合では、整数部分の変化が 305 Da であり、mass defect も 68.2 mDa と大きい。このように、第二相代謝では、第一相代謝による変化に比べ整数質量変化とともに mass defect もより大きくなる傾向があることから、容易に代謝反応を推測することができる (Table 3)。

Table 3 Mass defect in phase II metabolism

第 2 相代謝反応	組成式変化	質量変化 (Da)	整数質量変化 (Da)	mass defect (mDa)
硫酸抱合	+SO ₃	79.9568	80	-43.2
タウリン抱合	+C ₂ H ₅ NO ₂ S	107.0041	107	4.1
システイン抱合	+C ₃ H ₅ NO ₂ S	119.0041	103	4.1
アセチル化	+C ₂ H ₂ O	42.0106	42	10.6
メチル化	+CH ₂	14.0157	14	15.7
グリシン抱合	+C ₂ H ₃ NO	57.0215	57	21.5
グルクロン酸抱合	+C ₆ H ₈ O ₆	176.0321	176	32.1
GSH 抱合	+C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	305.0682	305	68.2

代謝物 C1 から C6 の mass defect は大きく (-57.6~52.5 mDa) 、さらに硫黄の付加を考え合わせると、GSH 抱合代謝を受けているものと考えられ、そこで次に MS/MS 分析を行い、代謝物と未変化体のスペクトルパターンの比較から代謝物の構造推定を試みた。

まず、lenvatinib (C7) のマスペクトルの特徴を調べた。本化合物は塩素原子を含むため、Figure 3 (A) に示すように、塩素原子に起因する特徴的な同位体スペクトル (m/z 429.1158) が観察された。また、 ^{35}Cl 及び ^{37}Cl の両者に由来する質量差 2 のプロトン付加分子を同時に低エネルギーCID に付したところ、+2 の同位体パターンを保ったまま、 m/z 327、353 及び 370 のプロダクトイオンが検出され、それぞれシクロプロピルアミン部分及びアミド部分がニュートラルロスすることに起因するフラグメントパターンであるものと考えられた。

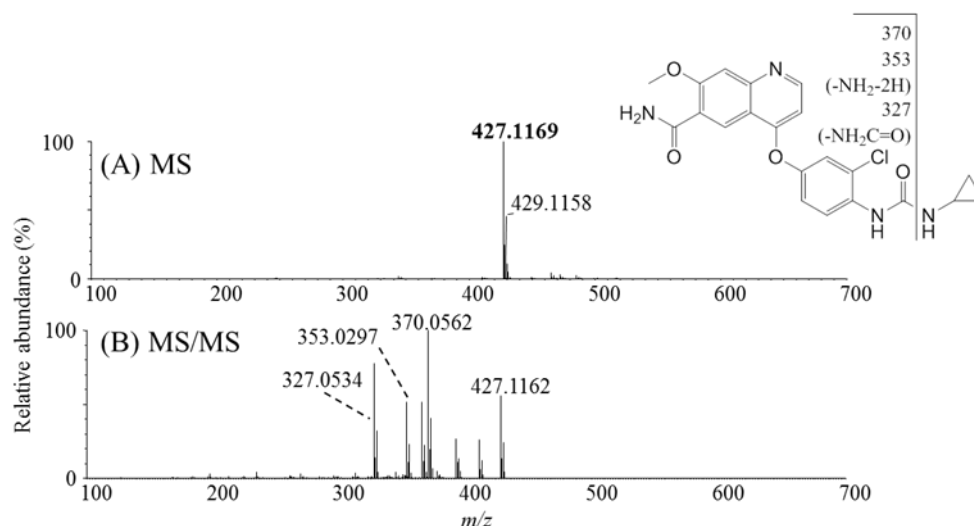


Figure 3 MS and product ion spectra of lenvatinib (C7)

一方、C1 から C6 の全ての代謝物のプロトン付加分子には、硫黄原子由来と思われる同位体パターン (^{32}S : ^{34}S =100:4.5) は認められたが、lenvatinib で見られた塩素原子由来の 3:1 の特徴的な同位体パターン (^{35}Cl : ^{37}Cl =100:32) が観察されず、すべての代謝物において、GSH が付加し、それに伴いクロロフェノキシ部分が脱離したものと考えられた。しかも、代謝物 C1~C6 のプロダクトイオンスキャンにおいて、末端のウレア部分のニュートラルロスも観察されなかった。以下に、各代謝物のマスペクトルの解析結果を詳細に述べる。

代謝物 C1 は尿中にのみ検出され、保持時間 12.2 分に溶出した。プロトン付加分子として m/z 293.0593 を与えたことから (Figure 4 (A))、組成式は $C_{13}H_{13}N_2O_4S^+$ (+0.7 ppm) と予想した (Table 1)。これは lenvatinib からクロロフェノキシ部分が脱離し、メルカプト酢酸が付加した組成式と一致した。また、Figure 4 (B) に示すように、プロダクトイオンスペクトル中に、 m/z 234、216 及び 161 のプロダクトイオンが検出され、さらに m/z 235.0490 にチオキノリン構造と思われるマイナーなプロダクトイオンも検出された。これらの結果は、代謝物 C1 が上述した通りメルカプト酢酸の付加体であるとの推定を支持するものであった。

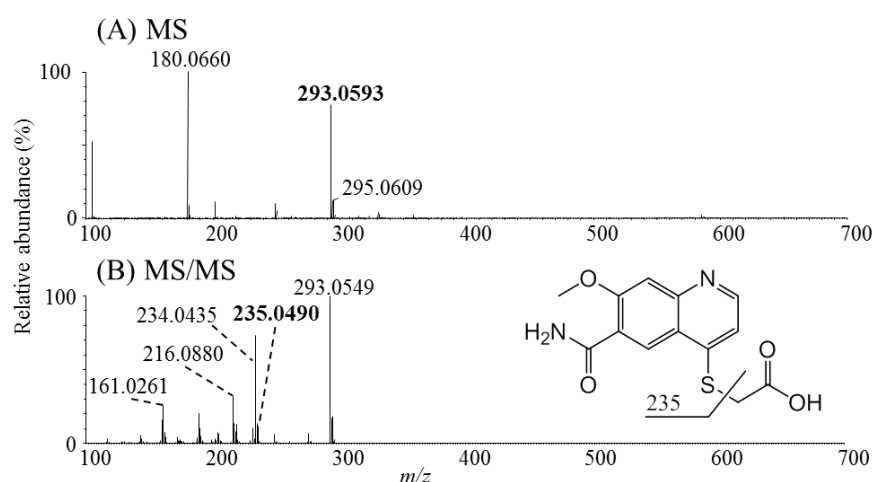


Figure 4 MS and product ion spectra of metabolite C1

代謝物 C2 は肝臓のホモジネート試料中に検出され、保持時間 13.1 分に溶出した。プロトン付加分子として m/z 508.1501 を与えたことから (Figure 5 (A))、組成式は $C_{21}H_{26}N_5O_8S^+$ (+0.8 ppm) と予想した (Table 1)。これは、lenvatinib からクロロフェノキシ部分が脱離し、代わりに GSH が付加した組成式と一致した。Figure 5 (B) に示すように、プロダクトイオンスペクトル中に、 m/z 379、235 及び 218 のプロダクトイオンが検出され、それぞれ GSH を構成するグルタミン酸、グルタミルアラニルグリシン及びグルタミルアラニルグリシンとアミノ基のニュートラルロスと一致した。これらのことから、代謝物 C2 は lenvatinib のキノリン部分に GSH が付加した S-GSH 付加体 (S-置換体) であると推定した。調査の結果、

Figure 6 に示すように、代謝物 C2 の構造は、すでに報告されているフェノキシキノリン誘導体 : AMG 458 のラット胆汁中代謝物と類似していた¹⁹⁾。この報告では、GSH が AMG 458 のキノリン部分へ求核攻撃することでフェノキシ部分が脱離する代謝反応が示されており、lenvatinib においても同様の反応が生体内で進行しているものと考えられた。

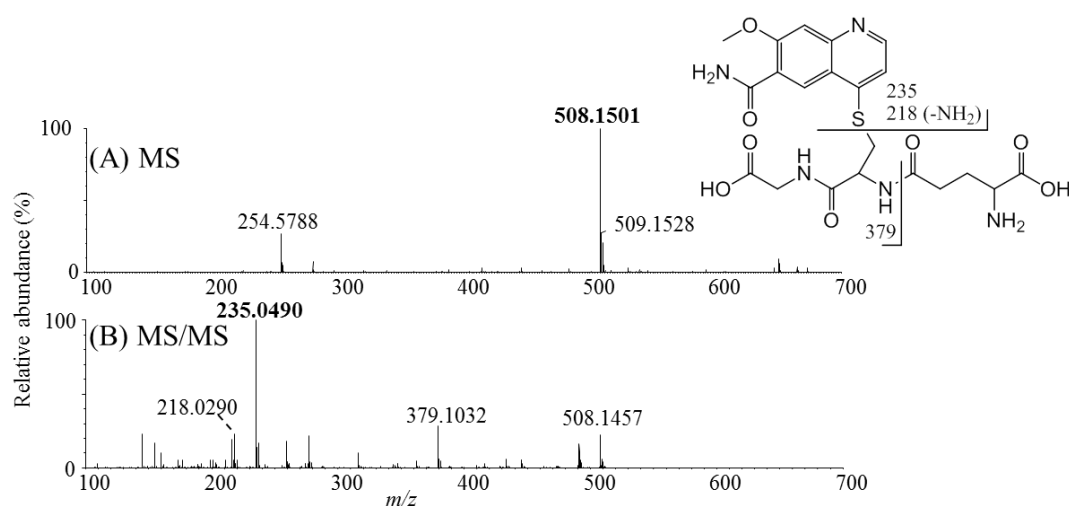


Figure 5 MS and product ion spectra of metabolite C2

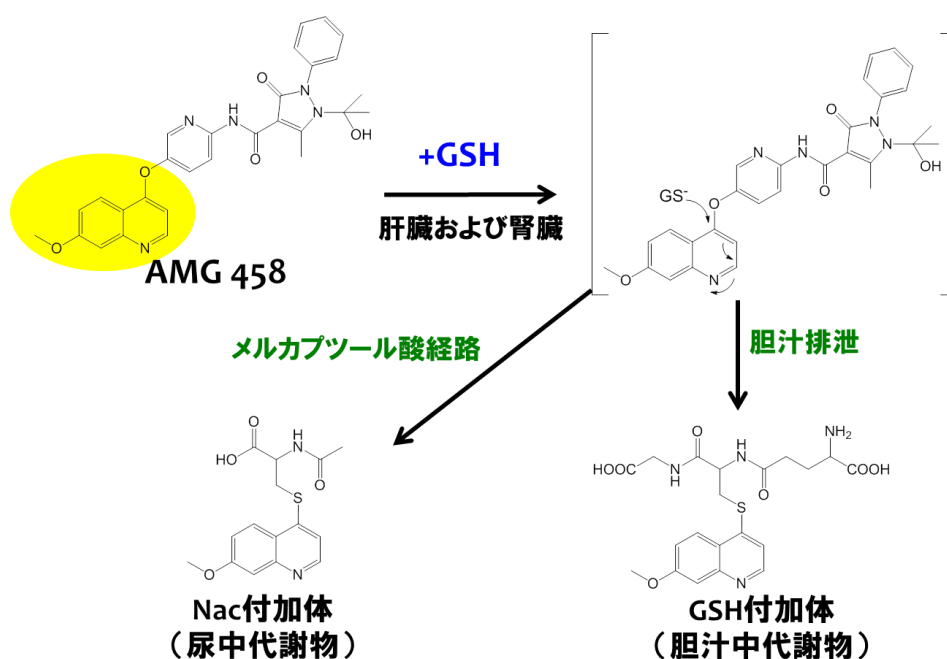


Figure 6 Metabolic pathway of AMG 458 observed after oral administration to rat (Teffer *et al* Chem. Res. Toxicol. 21, 2216-2222 (2008)¹⁹⁾より加工)

代謝物 C3 は胆嚢胆汁及び尿中に検出され、保持時間 13.5 分に溶出した。プロトン付加分子として m/z 641.1496 を与えたため (Figure 7 (A))、組成式は $C_{28}H_{29}N_6O_8S_2^+$ (+2.0 ppm) と予想した (Table 1)。この組成式は、lenvatinib からクロロフェノキシ部分が脱離して生成したキノリン部分の cysteine 付加体が二量化した組成式と一致した。Figure 7 (B) に示すように、プロダクトイオンスペクトル中に、 m/z 354、288 及び 244 のプロダクトイオンが検出された。このうち、 m/z 244.1064 は、キノリン部分にエチルアミンが付加した非常に特徴的な構造に由来するプロダクトイオンで、このイオンの存在により cysteine がアミノ基を介してキノリン部分に結合していることが示唆された。このように、cysteine がアミノ基を介して芳香環に結合するような代謝反応はこれまで報告されておらず、二量化のみならず、新たな代謝物生成経路の一つと考えられることから、更に詳細な検討を行なった。

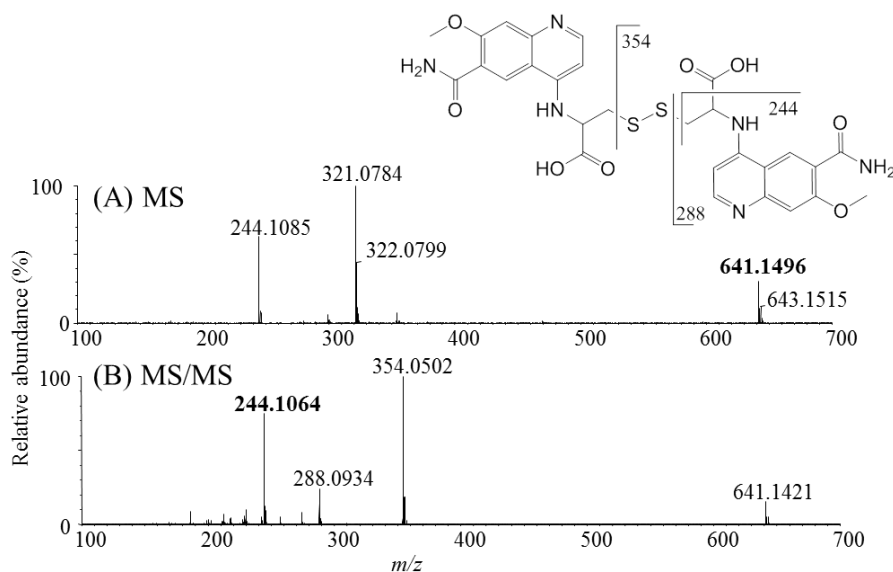


Figure 7 MS and product ion spectra of metabolite C3

代謝物 C4 は尿中に検出され、保持時間 14.1 分に溶出した。プロトン付加分子として m/z 698.1694 を与えたことから (Figure 8 (A))、組成式は $C_{30}H_{32}N_7O_9S_2^+$ (+0.4 ppm) と予想した (Table 1)。この組成式は、C3 にグリシンを加えた組成と一致したことから、キノリン部分への cysteinylglycine 付加体と cysteine 付加体の二量体であると推測した。Figure 8 (B) に示すように、プロダクトイオンスペクトル中に、 m/z 411 及び 244 のプロダクトイオンが検

出され、 m/z 244.1064 は代謝物 C3 と同じくキノリン部分にエチルアミンが付加した構造に由来するものと考えられた。また、 m/z 411.0778 はキノリン部分の disulfanyl *N*-cysteinylglycine 付加構造と考えられたことから、代謝物 C4 はキノリン部分の *N*-cysteinylglycine 付加体と *N*-cysteine 付加体がジスルフィド結合を介して二量化した代謝物であると推定した。

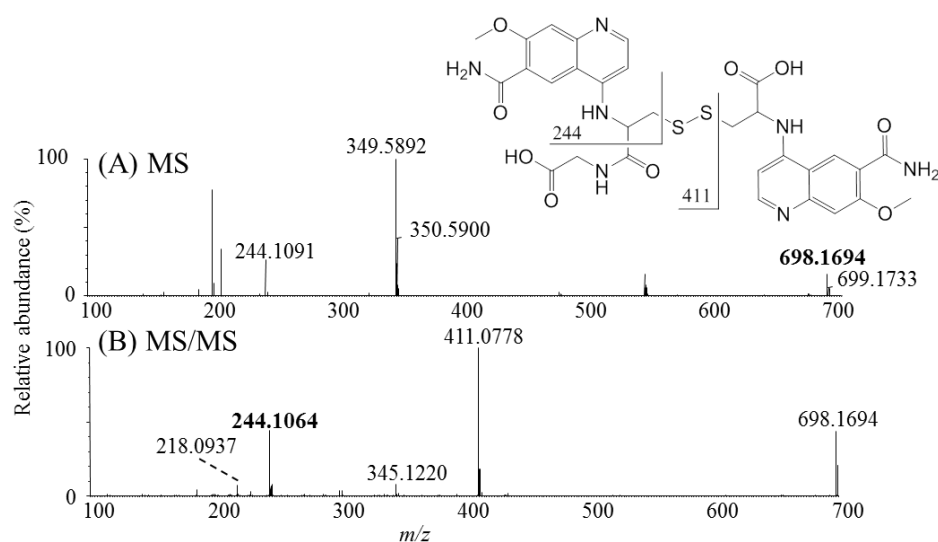


Figure 8 MS and product ion spectra of metabolite C4

代謝物 C5 は胆嚢胆汁及び肝臓のホモジネート試料中に検出され、保持時間 14.5 分に溶出した。プロトン付加分子として m/z 322.0864 を与えたため (Figure 9 (A))、組成式は $C_{14}H_{16}N_3O_4S^+$ (+2.5 ppm) と予想した (Table 1)。これは、lenvatinib からクロロフェノキシ部分が脱離したキノリン部分の cysteine 付加体の組成式と一致した。Figure 9 (B) に示すように、プロダクトイオンスペクトル中に、 m/z 276、244 及び 218 のプロダクトイオンが検出され、 m/z 244.1064 は C3 及び C4 で検出されたものと同様に、キノリン部分にエチルアミンが付加した構造に由来するものと推察された。また、 m/z 276.0821 はカルボキシル基の脱離を示唆し、 m/z 218.0937 は cysteine のチオ酢酸部分の脱離によるものと推察できることから、代謝物 C5 はキノリン部分の *N*-cysteine 付加体であると推定した。

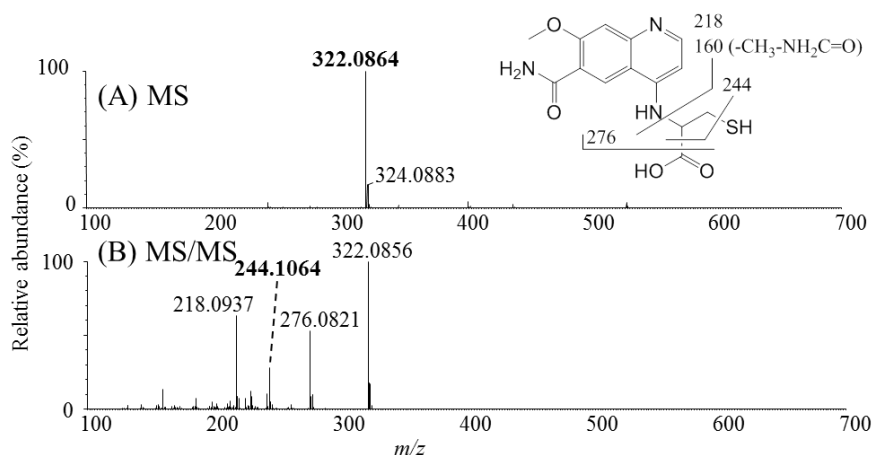


Figure 9 MS and product ion spectra of metabolite C5

代謝物 C6 は胆嚢胆汁、尿及び肝ホモジネートからの抽出物において検出され、保持時間 17.1 分に溶出した。プロトン付加分子として m/z 522.1436 を与えたため (Figure 10 (A))、組成式は $C_{25}H_{24}N_5O_6S^+$ (+1.1 ppm) と予想した (Table 1)。この組成式は、フェノキシキノリン部分が脱離した 2 分子のキノリン部分が、1 分子の cysteine を介して結合した組成式と一致した。Figure 10 (B) に示すように、プロダクトイオンスペクトル中に、 m/z 505 及び 244 のプロダクトイオンが検出された。特に、 m/z 244.1064 は、代謝物 C3、C4 及び C5 と同様、キノリン部分にエチルアミンが付加した構造に由来し、 m/z 505.1212 はアミノ基の脱離によるものと考えられた。これらの結果から、代謝物 C6 は cysteine がキノリン部分に *N*-cysteine 付加した部分構造を持つものと考えられた。さらに興味深いことに、代謝物 C6 の組成式からは、キノリン部分への *N*-cysteine 付加体のみならず *S*-cysteine 付加した部分構造の存在が示唆された。これらの構造情報から代謝物 C6 の代謝反応機構を考察すると、lenvatinib の代謝過程で生成したキノリン部分の *N*-cysteine 付加体 (C5) に存在する遊離チオール基によって、もう 1 分子の lenvatinib に求核置換反応が起こり、同時にクロロフェノキシ部分が脱離することで、最終的に 2 分子のキノリン部分に 1 分子の cysteine がアミノ基及びチオール基を介して結合した *N, S*-cysteine 付加体として代謝物 C6 が生成するものと推察した。

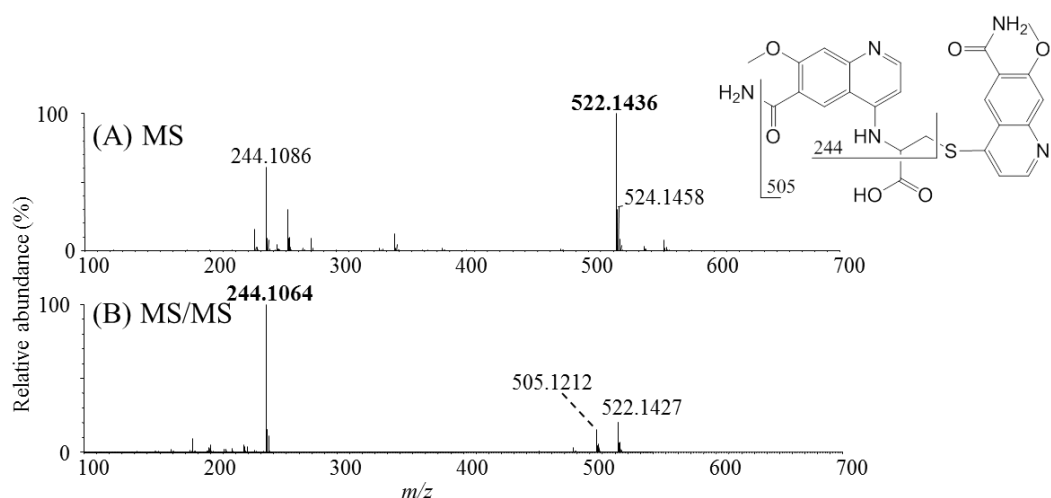


Figure 10 MS and product ion spectra of metabolite C6

第三節 NMR による C1、C3 及び C4 の構造同定

代謝物 C1、C3 及び C4 は尿中の主要成分として検出され、凍結乾燥した尿から、HPLC によってこれらを単離精製した。得られた代謝物は重メタノールに溶解し、溶媒由来のメタノールをリファレンスとしてケミカルシフト値を得た。構造同定のために、代謝物 C1、C3 及び C4 のプロトン NMR 及び二次元 NMR を取得し、この時のプロトン NMR の結果を Table 4 に示し、得られた構造と NOESY の結果を Figure11 に示した。

代謝物 C1 は、MS 分析の結果から lenvatinib のキノリン部分にメルカプト酢酸が付加した代謝物と推定された。NMR 分析の結果より、代謝物 C1 はキノリン部分に由来するシグナルを示したが、未変化体で確認されたクロロフェノキシ部分とシクロプロピル部分のシグナルは消失し、メルカプト酢酸に由来するメチレンが、3.84 ppm に 2H 分のケミカルシフトを与えた。Figure 11 に示すように、NOESY の結果から、メルカプト酢酸部分のメチレンプロトン (H-6) とキノリン環の 3 位のプロトン (H-2) との間に相関が得られたため、メルカプト酢酸分子がキノリン環の 4 位に結合していることが示された。以上、NMR と MS の分析結果から、代謝物 C1 はクロロフェノキシ部分の脱離を伴ったキノリン環 4 位のメルカプト酢酸付加体であると決定した。

Table 4 Summary of one-dimensional proton NMR chemical shifts of lenvatinib and its metabolites, C1, C3, and C4

Position	δ_{H} (Integration, Multiplicity ^a , <i>J</i> in Hz)			
	Lenvatinib	C1	C3	C4
1	8.85 (1H, d, 7)	8.58 (1H, d, <i>J</i> = 5)	8.16 (2H, d, <i>J</i> = 7)	8.26 (1H, d, <i>J</i> = 6)
2	6.98 (1H, d, <i>J</i> = 7)	7.32 (1H, d, <i>J</i> = 5)	6.54 (2H, d, <i>J</i> = 7)	6.62 (1H, d, <i>J</i> = 6)
3	9.01 (1H, s)	8.79 (1H, s)	8.74 (2H, s)	8.81 (1H, s)
4	7.57 (1H, s)	7.45 (1H, s)	7.08 (2H, s)	7.17 (1H, s)
5	4.19 (3H, s)	4.07 (3H, s)	4.04 (6H, s)	4.06 (3H, s)
6	7.52 (1H, d, 2)	3.84 (2H, s)	4.47 (2H, dd, <i>J</i> = 9.5)	4.73 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5)
7	8.30 (1H, d, 9)	-	3.51 (2H, dd, <i>J</i> = 14.5, Ha)	3.56 (1H, dd, <i>J</i> = 14.5, Ha)
			3.22 (2H, dd, <i>J</i> = 14.9, Hb)	3.19 (1H, dd, <i>J</i> = 14.9, Hb)
8	7.30 (1H, dd, 9.2)	-	-	3.81 (1H, d, <i>J</i> = 17, Ha)
				3.68 (1H, d, <i>J</i> = 17, Hb)
9	2.63 (1H, m)	-	-	-
10	0.78 (1H, m, Ha)	-	-	-
	0.55 (1H, m, Hb)			-
11	0.78 (1H, m, Ha)	-	-	-
	0.55 (1H, m, Hb)			-
1'	-	-	-	8.19 (1H, d, <i>J</i> = 7)
2'	-	-	-	6.62 (1H, d, <i>J</i> = 7)
3'	-	-	-	8.76 (1H, s)
4'	-	-	-	7.08 (1H, s)
5'	-	-	-	4.06 (3H, s)
6'	-	-	-	4.54 (1H, m)
7'	-	-	-	3.58 (1H, dd, <i>J</i> = 13.5, Ha)
				3.28 (1H, m, Hb)

a: Multiplicities are reported as s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublet, and m = multiplet.

代謝物 C3 は、MS 分析の結果からキノリン部分の *N*-cysteine 付加体同士がジスルフィド結合を介して二量化した代謝物と推定した。NMR 分析の結果、代謝物 C1 と同じく、クロロフェノキシ部分とシクロプロピル部分のシグナルは確認されず、cysteine の α 位のメチンが 4.47 ppm に、 β 位のメチレンが 3.51 ppm 及び 3.22 ppm に検出された。Figure 11 に示すように、NOESY によって cysteine のメチンのプロトン (H-6) とキノリン環の 3 位のプロトン

(H-2) の間に相関が得られたことから、cysteine 分子がアミノ基を介してキノリン環の 4 位に結合した *N*-cysteine 付加体であると同定した。以上、NMR と MS の分析結果から、代謝物 C3 はキノリン環 4 位の *N*-cysteine 付加体同士がジスルフィド結合を介して二量化したホモ二量体であると決定した。

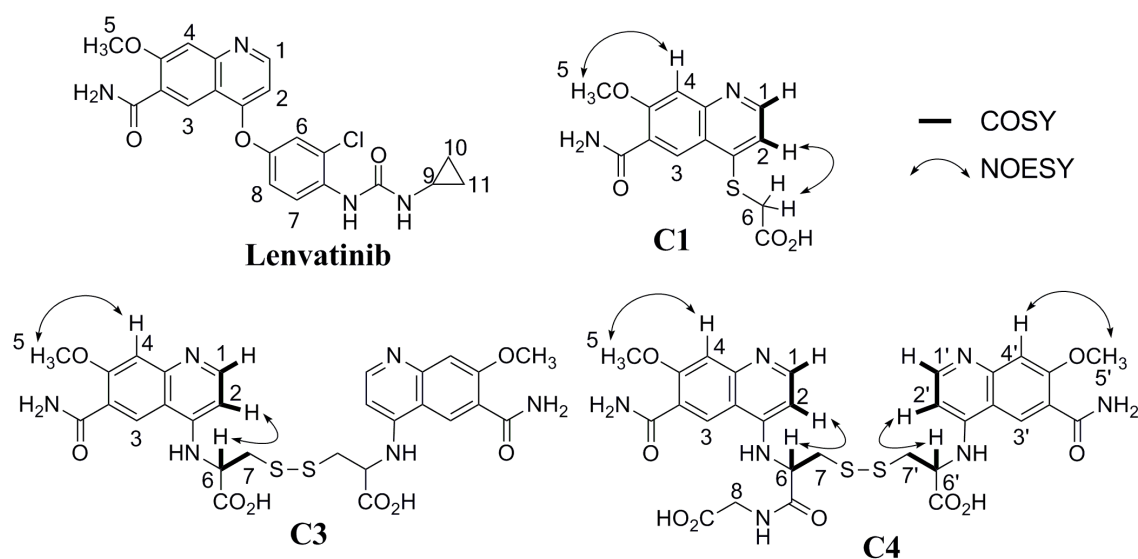


Figure 11 Correlation observed from NOESY

代謝物 C4 は、MS 分析の結果からキノリン部分の *N*-cysteine 付加体とキノリン部分の *N*-cysteinylglycine 付加体がジスルフィド結合を介して二量化したヘテロ二量体であると推定した。NMR 分析の結果、代謝物 C1 及び C3 と同じく、クロロフェノキシ部分とシクロブロピル部分のシグナルは確認されず、観測されたキノリン部分のプロトンは 2 対存在した。この結果は、ホモ二量体である代謝物 C3 とは異なっており、lenvatinib のキノリン部分に異なる分子が結合しているヘテロ二量体であることを示唆していた。加えて、cysteine 及び cysteinylglycine 由来のプロトンが検出されたことから、MS 分析から予想した *N*-cysteine 付加体と *N*-cysteinylglycine 付加体の二量体構造を支持していた。Figure 11 に示すように NOESY によって、2 分子の cysteine のメチンのプロトン (H-6 及び H-6') と 2 分子のキノリン部分のそれぞれ 3 位のプロトン (H-2 及び H-2') との間に相関を得たことから、それぞ

れのキノリン環の4位に cysteine 及び cysteinylglycine がアミノ基を介して結合していることが明らかとなった。以上、NMR と MS の分析結果から、代謝物 C4 はキノリン部分の *N*-cysteine 付加体及び *N*-cysteinylglycine 付加体がジスルフィド結合で二量化したヘテロ二量体であると決定した。

第四節 代謝物 C2 (GSH 付加体) 生成における酵素の寄与

MS 及び NMR による構造解析の結果から、代謝物 C1、C3、C4、C5 及び C6 はキノリン部分の GSH 抱合体である代謝物 C2 から派生した代謝物であると推測された。そこで、初発代謝物と考えた C2 生成への酵素の関与を検討した。生体内における GSH 抱合体の生成には、glutathione *S*-transferase (GST) による直接的な抱合反応ならびに CYP による酸化反応と GST による協奏反応を考え、これらの酵素を含む、ラット、サル及びヒト肝 S9 画分を用いて lenvatinib と GSH をインキュベーションし、代謝物 C2 の生成を検討した。

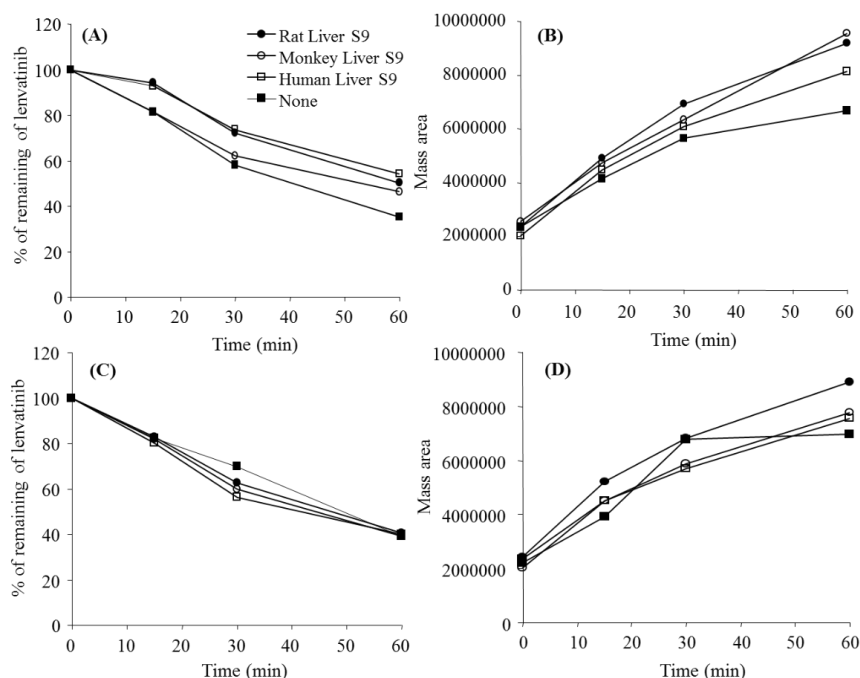


Figure 12 Contribution of enzymatic activities to form metabolite C2

Each figure shows percentage of remaining lenvatinib with (A) or without (C) NADPH and mass area of metabolite C2 formed with (B) or without (D) NADPH.

その結果、酵素源（肝 S9 画分）あるいは CYP の補酵素である NADPH の有無に関わらず lenvatinib は経時的に減少し（Figure 12 (A) 及び (C) の None）、代謝物 C2 がいずれの条件においても同程度生成したことから（Figure 12 (B) 及び (D) の None）、代謝物 C2 は lenvatinib と GSH から非酵素的（化学的）に生成し、反応機構は Figure 6 に示した AMG 458 と同様に、GSH のチオール基による lenvatinib のキノリン環 4 位への求核置換反応であることを確認した。

第五節 Lenvatinib の代謝物生成機構の解明

第四節までに、lenvatinib は GSH と非酵素的に反応し、クロロフェノキシ部分の脱離を伴い代謝物 C2 を与えることを明らかにした。代謝物 C1 と C2 は、プロダクトイオンスペクトルで m/z 235 のプロダクトイオンを与え、メルカプト酢酸あるいは GSH とチオエーテル結合によりキノリン部分と結合している S-置換体と考えられた。一方、その他の代謝物 (C3、C4、C5 及び C6) では、プロダクトイオンスペクトルにおいて m/z 244 のプロダクトイオンを与えたことから、チオエーテル結合ではなく、アミノ基とキノリン部分が結合した N-cysteine 誘導体 (N-置換体) であると推察された。代謝物 C3~C6 が代謝物 C2 から生成すると仮定すると、代謝物 C2 のチオエーテル結合が代謝物 C3~C6 の生成過程で開裂し、新たにアミノ基とキノリン部分の結合が形成され、N-置換体へ変換されたことになる。一方、代謝物 C3~C6 が代謝物 C2 とは無関係に生成することを仮定した場合には、cysteine のアミノ基が直接 lenvatinib のキノリン部分に求核置換反応し、N-置換体が生成することになる。このように代謝物 C3~C6 の生成には 2 つの経路が考えられることから、cysteine 誘導体は、GSH、cysteine、cysteine のアミノ基が修飾された N-acetyl cysteine (Nac) 及び cysteine のチオール基が修飾された S-methyl cysteine を用いて、N-置換体の生成メカニズムを検討した (Figure 13)。

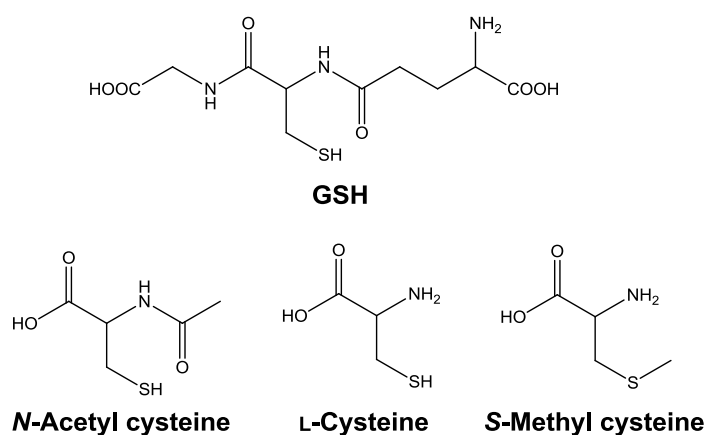


Figure 13 Chemical structures of cysteine derivatives

その結果、Figure 14 (A) に示すように、*S*-methyl cysteine 以外の誘導体において lenvatinib の減少が観察され、同時にそれぞれの付加体の生成が確認された (Figure 14 (B))。GSH と Nac は cysteine のアミノ基部分が修飾されており、検出されたそれぞれの付加体のプロダクトイオンは m/z 235 のみであったことから、GSH と Nac は lenvatinib のキノリン部分と *S*-置換体のみを生成したと考えられた。また、cysteine のジスルフィド体である cystine は lenvatinib と反応し C3 を生成しないことも確認しており、これらの結果は、lenvatinib はチオール基と非酵素的に分子間求核置換反応を起こすが、アミノ基はこの求核置換反応に直接関与しないことを示唆した。

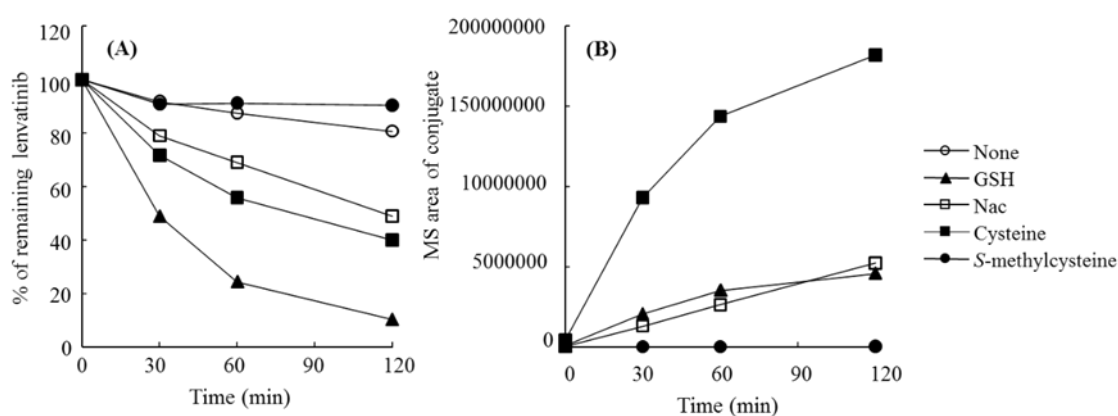
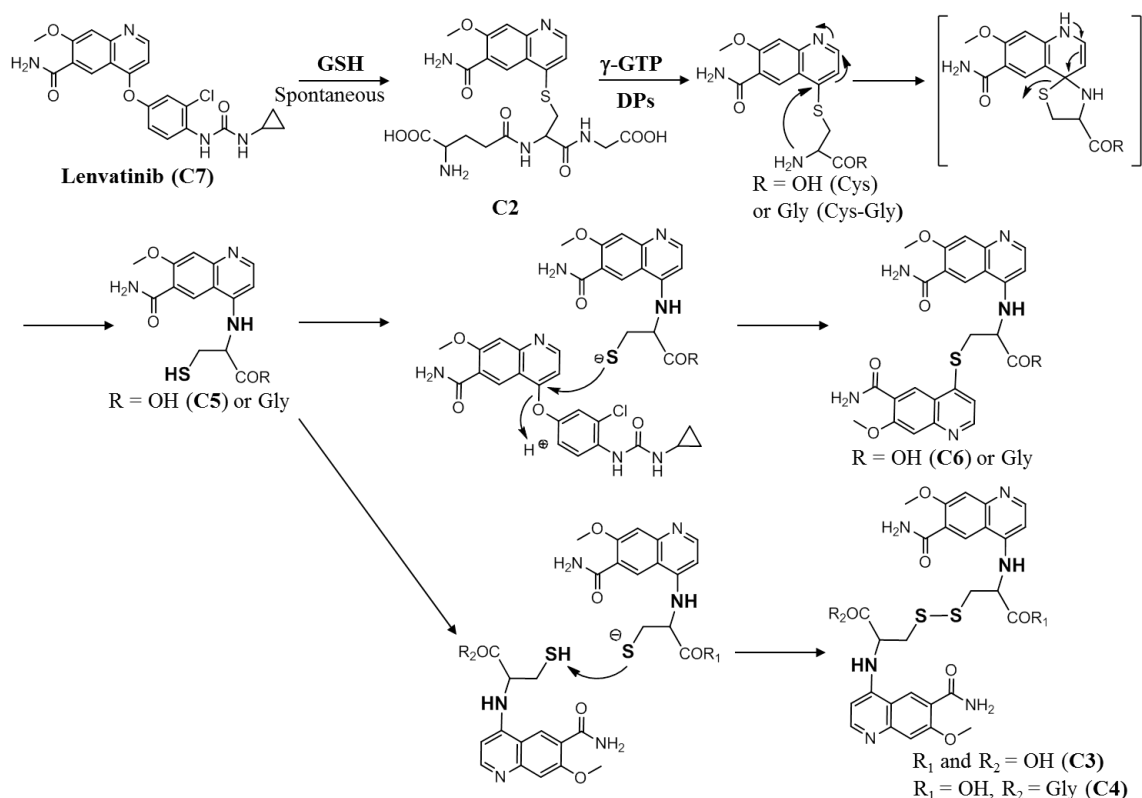


Figure 14 Reactions of cysteine derivatives with lenvatinib
Percentage of remaining lenvatinib (A) and mass area of each adduct formed (B).

一方、cysteine と lenvatinib の反応で検出された付加体は、プロダクトイオンとして m/z 244 のみを生じたことから N -置換体であり、cysteine のアミノ基による分子内転移反応の可能性が考えられた。以上の結果から、lenvatinib は cysteine のチオール基による求核置換反応により、チオエーテル結合体である S -置換体を生成することが第一ステップであり、次いで分子内のアミノ基による求核置換反応によって、チオエーテル結合の開裂とアミノ基との結合形成が速やかに進行することで、 S -置換体から N -置換体に変換されたものと考えられた。本検討によって、cysteine と lenvatinib の反応により S -置換体から N -置換体への変換が明らかになったことで、複雑な構造を有する代謝物 C3~C6 の生成には、この N -置換体の生成がトリガーになっていることが明らかとなった。

以上の結果をまとめると、lenvatinib の代謝物である C2~C6 は、Scheme 1 に示す経路で生成したと推察された。



Scheme 1 Proposed formation mechanism for the metabolites of lenvatinib (C2-C6)

まず、lenvatinib は肝臓や腎臓においては、内在性の GSH との求核置換反応により、キノリン部分と GSH がチオエーテル結合を介して縮合し、代謝物 C2 が生成すると同時にクロロフェノキシ部分が脱離する。代謝物 C2 は γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) により加水分解されグルタミン酸が脱離した S-cysteinylglycine 付加体に変換され、あるいは続いて dipeptidase (DP) による加水分解を受けると S-cysteine 付加体に変換される。この時、cysteine 分子由来の分子内アミノ基により求核置換反応が進行すると、S-置換体は一時的に五員環性の中間体を経て、N-cysteinylglycine 付加体や N-cysteine 付加体（代謝物 C5）に変換される。キノリン部分の N-cysteinylglycine 付加体も、DP によって加水分解され得るため、N-cysteine 付加体（代謝物 C5）が生成する。N-Cysteinylglycine 付加体及び代謝物 C5 は、遊離のチオール基を有することから、ジスルフィド結合により二量化し、代謝物 C3 及び C4 が生成する。また、N-置換体のチオール基がもう 1 分子の lenvatinib に求核置換反応した場合には、cysteinylglycine あるいは cysteine により lenvatinib のキノリン分子同士が架橋された N,S-cysteine 付加体（代謝物 C6）を生成すると考えられ、lenvatinib はサルにおいてきわめてユニークな経路によって代謝されていることが明らかとなった。

第六節 結果の考察

本研究において、lenvatinib の複雑な代謝経路を解明するにあたり、GSH 抱合体である代謝物 C2 の生成と、それに続く分子内及び分子間の様々な反応が重要な鍵であった。生体内における GSH 抱合体への代謝はよく知られており、多くの外因性及び内因性の求電子性物質は、主要な代謝臓器である肝臓や腎臓において GSH 抱合を受け、無毒化されて体外へ排泄される⁷⁾。肝臓では、GSH 抱合反応を触媒する GST が抱合体の生成に関わると考えられるが、直接 GSH との求核置換反応が進行し、非酵素的に GSH 抱合体が生成することも報告されている^{7,19)}。生成した GSH 抱合体は、 γ -GTP によってグルタミン酸が加水分解され、cysteinylglycine 抱合体となり、さらに DP により加水分解されると、最終的に cysteine 抱合

体に変換される⁷⁾。これらの代謝産物は、肝臓から胆汁を経て体外に排泄される。一方、腎臓では肝臓同様に GSH 抱合体が生じ、その後順次加水分解されるが、肝臓との違いはメルカプツール酸経路の存在である⁷⁾。すなわち、cysteine 抱合体は *N*-acetyltransferases (NATs) により、*N*-acetyl cysteine 抱合体に変換され、一部は更に代謝を受け β -lyase により *S*-メチル抱合体などに変換されて体外に排泄される。

肝臓や腎臓における GSH 抱合体の一般的な代謝経路に、今回得られた結果を考え合わせると、サルにおける lenvatinib の代謝経路は、以下に示すように 3 段階の反応を経て進行すると考察できる。

- 1) 分子間求核置換反応 (*S*-置換体の生成) : Lenvatinib のキノリン環の 4 位へ GSH のチオール基が求核置換反応することにより、チオエーテル結合が形成され、*S*-置換体である代謝物 C2 が生成すると同時に、lenvatinib からクロロフェノキシ部分が脱離する。
- 2) 分子内求核置換反応 (*N*-置換体への変換) : 代謝物 C2 が γ -GTP 及び DP によって加水分解されると *S*-cysteinylglycine あるいは *S*-cysteine 付加体となり、cysteine の遊離アミノ基がキノリン環の 4 位で五員環の安定構造を取るよう分子内求核置換反応が進行し、チオエーテル結合が開裂して新たにアミノ基との結合が形成されることで、*S*-置換体から *N*-置換体である代謝物 C5 に変換される。
- 3) ダイマー形成反応 (二量体への変換) : 上記 2) で生成した *N*-置換体代謝物 C5 あるいは *N*-cysteinylglycine 付加体は、分子内に遊離のチオール基を有するため、ジスルフィド化が起こり、*N*-置換体同士の二量体である代謝物 C3 及び C4 が生成する。一方、*N*-置換体代謝物 C5 のチオール基がもう 1 分子の lenvatinib との間で分子間求核置換反応すると、その lenvatinib のクロロフェノキシ部分が脱離し、2 分子のキノリン部分が cysteine を介して結合した *N,S*-cysteine 付加体であるジキノリン体代謝物 C6 が生成する。

精密質量分析計を用いて lenvatinib をサルに投与したときの生体試料の分析を行った結果、代謝物はその組成式に硫黄原子を含むことを推測するとともに、mass defect が ± 50 mDa 程度と大きかったことから、GSH 抱合代謝の存在を予測することができた。また、MS スペクト

ルの解析では、lenvatinib に特徴的な塩素原子由来の同位体スペクトルが代謝物では消失したことに加え、プロダクトイオンスペクトルに基づいて、*S*-置換体（チオキノリン構造、 m/z 235）と *N*-置換体（エチルアミン付加体構造、 m/z 244）を区別できたことが、ユニークな代謝物の構造推定に至った大きな要因である。

Lenvatinib の GSH 抱合代謝に対する構造的特徴は、4-フェノキシキノリン部分が GSH による求核置換反応を受けやすいことである。同様の反応は AMG 458 で報告されており、ラットの経口投与後の胆汁中代謝物として GSH による求核置換体が検出されている¹⁹⁾。この報告によると、ラットでは *S*-置換体である GSH 抱合体が胆汁中の主要成分であり、尿中ではメルカプツール酸経路により生成した Nac 付加体が検出された (Figure 6)。Lenvatinib も AMG 458 と同様に、GSH による分子間求核置換反応により肝臓中では代謝物 C2 (GSH 抱合体) を生成したが、胆嚢胆汁中には、代謝物 C3、C5 及び C6 が検出され、代謝物 C2 は未検出であったことが AMG 458 とは大きく異なっていた (Figure 6)。この相違については、サル肝臓の γ -GTP 活性がラットに比べて高いことや、サル胆嚢における γ -GTP 活性が高いことによって、サルでは代謝物 C2 が速やかに加水分解され cysteinylglycine 付加体に変換されたことに基づくと考えられた¹⁰⁾。この γ -GTP による加水分解は、cysteine 部分のアミノ基の遊離につながるため、*N*-置換体生成のトリガーとなると推察した。また、サルでは胆嚢での濃縮によって、*N*-置換体のジスルフィド化も促進されることが考えられ、これら種々の要因からラットで検討された AMG 458 の代謝物には報告されていない、*N*-置換体由来する各種二量体 (代謝物 C3~C6) などのユニークな代謝物が検出されたと考えられる。これらの代謝物は、lenvatinib 投与時のヒト試料中にも検出されており、霊長類に共通した事象であることを示唆する貴重な情報である。一方、血漿中には、C1~C6 の全ての代謝物が検出されなかったことから、lenvatinib は血流を介して腎臓に到達し、腎臓で GSH 抱合を受けた後に代謝物 C1、C3、C4 及び C5 に変換されたものと考えられ、胆嚢同様、膀胱での濃縮によって *N*-置換体が二量化したと推察された。また、尿中代謝物として特徴的であったメルカプト酢酸付加体 (代謝物 C1) の生成機構を既報^{6,12,16,17)} の代謝経路に基づいて考察する

と、まず代謝物 C2 が γ -GTP と DP による加水分解の末に *S*-cysteine 付加体となり、続いて酸化脱アミノ反応によりアミノ基がカルボニル基に変換されると、加水分解による脱カルボン酸化が進行し、メルカプト酢酸付加体である代謝物 C1 が生成したと考えられた (Figure 15)。

これまで述べたように、GSH による分子間求核置換反応によって、lenvatinib は C2 を生成するが、同時にクロロフェノール体が生成すると考えられた。Figure 1 に示すように、lenvatinib のクロロフェノキシ部分は放射性同位元素で標識されていない部分であり、C2 生成後のクロロフェノール体の存在はラジオクロマトグラムには反映されない。従って、脱離したクロロフェノール体の消失経路を確認するために、クロロフェノール体とその代謝物を精密質量分析計によって検索し、構造解析を行なった。その結果、クロロフェノール体、クロロフェノール体の硫酸抱合体、クロロフェノール体のグルクロン酸抱合体を各生体試料中に検出した。クロロフェノール体は、代謝的活性化により反応性のキノンイミン構造をとり得ると考えられたが、GSH 関連代謝物の生成は認められておらず、脱離後のクロロフェノキシ部分は主に抱合体となって生体から消失すると考えられた。

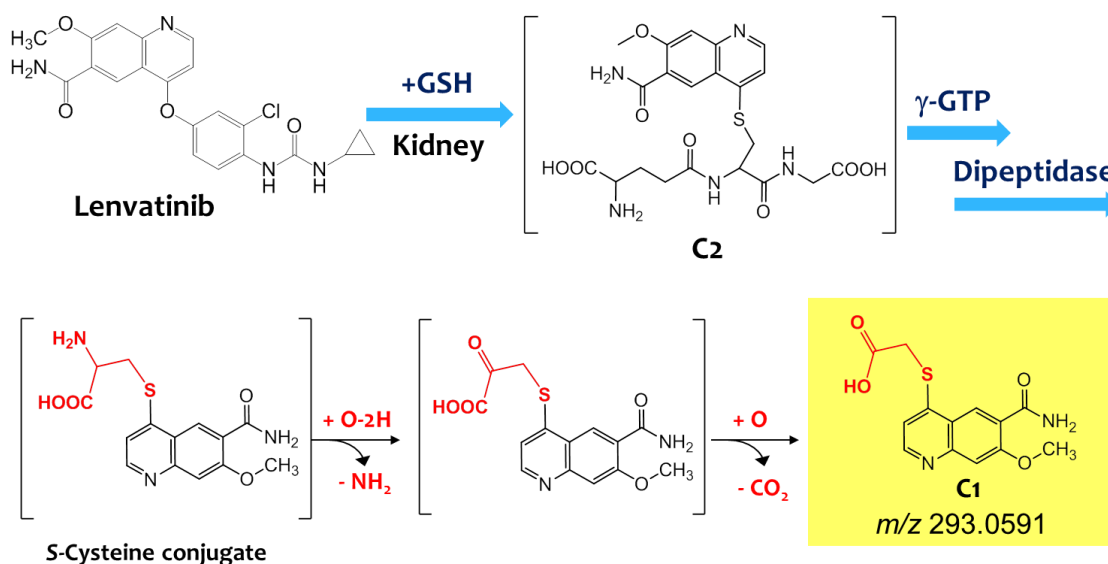


Figure 15 Proposed formation mechanism of metabolite C1 in kidney

分子内でアミノ基とチオール基が置換することは、アシルグルクロン酸抱合体が GSH と置換した後のアシルグルタチオン付加体で観察されており、この場合も γ -GTP によるグルタミン酸の脱離が引き金となって cysteine のアミノ基がカルボニル基へ求核置換反応し、アミノ基とチオール基の置換が起こる^{8,9,18)}。アシルグルタチオン構造では、求電子性のカルボニル基が GSH と縮合することにより、求電子性の高いチオエステル構造に変換され、 γ -GTP によって求核基である cysteine 部分のアミノ基が遊離すると分子内で求核置換反応が促進され、*N*-置換体が生成すると考えられている。しかし、本研究で明らかとなったキノリン誘導体のような芳香族構造において、cysteine 部分のアミノ基による分子内求核置換反応が進行することはこれまでに報告のない新しい知見であり、本研究では lenvatinib のユニークな代謝経路を解明するだけでなく、医薬品開発上、フェノキシキノリンを部分構造として含む医薬候補品の代謝物の構造解析に関わる貴重な情報が得られ、現在進行中の lenvatinib のヒト臨床試験においても、尿や糞中で構造が未知であった代謝物の構造同定に大きく寄与するものであった。

本研究では、精密質量分析計による代謝物分析技術の有用性だけでなく、サルやヒトなど霊長類におけるフェノキシキノリン誘導体の新規 GSH 抱合代謝経路を明らかにすることができた。この経路の初発は GSH による化学的な求核置換反応であるが、続く加水分解酵素の活性の種間での違いや、サルやヒトでは胆嚢での濃縮も関わって、フェノキシキノリン誘導体の代謝物の表現型が動物種によって異なることは大変興味深い知見である。Lenvatinib の代謝経路の解明では、フェノキシキノリン部分の GSH による求核置換反応後に γ -GTP による加水分解を引き金とした、芳香族では報告例のない分子内求核置換反応による *N*-cysteine 誘導体の生成を明らかにした。さらに、それらが分子間で求核置換反応あるいは縮合し、二量化することも判明した。これらの知見は、生体内における新たな薬物代謝経路の発見につながり、実に巧妙な反応系によって薬物が代謝されることへの理解という観点でも、きわめて意義深いものと考えられる。

第二章 計算法的手法を用いた microsomal glutathione S-transferase による 2-chloropyridine 誘導体への芳香族求核置換反応機構の解明

第一節 序

第一章では、フェノキシキノリン誘導体における芳香族求核置換反応によって生成するユニークな代謝物の構造解析について述べた。

求電子性物質は、生体内においてチオール基やアミノ基のような求核性の官能基を豊富に持つ生体高分子と共有結合し、毒性発現や CYP などの代謝酵素の不活性化に関わると考えられている。生体は種々の防御機構によりこのような求電子性物質を排除しており、その一端を担うのが GST である。GST は、可溶性画分に存在する cytosolic GST、ミトコンドリアに存在する mitochondrial GST、及び膜結合型の microsomal GST に大別される⁷⁾。それらは、求核剤である GSH を求電子性の物質と結合させる反応を触媒するため、GST の基質性に影響を及ぼす因子の解明により、求電子性の原因構造を探索することができると考えた。求電子物質が生体高分子と共有結合し得ることを考慮すると、求電子性の原因構造を探索することは、すなわち生体高分子と共有結合しないより安全性の高い医薬品候補化合物を見出す上で役立つと考えられる。

そこで、第二章では、反応機構が報告されている rat microsomal GST²⁸⁾によって触媒され、ピリジン環における芳香族求核置換反応によって生成する新規 GSH 付加体構造を精密質量分析計で解析するとともに、この求核置換反応のトリガーとなる薬物の求電子性に関与する構造因子を精査するため、本酵素の基質として新たに見出した 2-chloropyridine 誘導体の反応速度から、計算法的手法を用いて本反応をモデル化した。

第二節 新規 2-glutathionyl-3-nitropyridine の精密質量分析計による構造解析

ラット肝ミクロソーム中で GSH と 2-chloro-3-nitropyridine をインキュベーションしたときに、塩素原子が GSH によって置換された新規 GSH 抱合代謝物が得られた (Figure 16)。

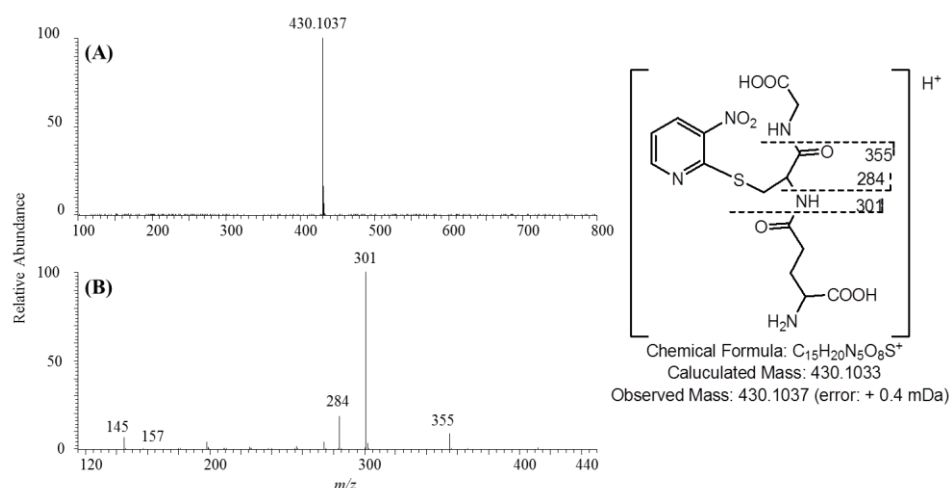


Figure 16 Mass spectra of 2-glutathionyl-3-nitropyridine

(A) Full scan spectrum, (B) MS/MS spectrum of a molecular ion of m/z 430

本 GSH 抱合体は、精密質量分析において m/z 430.1037 を示した。予想された組成式から算出したプロトン付加分子の m/z は 430.1033 ($C_{15}H_{20}N_5O_8S^+$) であり、実測値との差は 0.4 mDa (0.9 ppm) であった (Figure 16 (A))。また、塩素原子由来の特徴的な同位体スペクトルが観測されず、プロダクトイオンスペクトル中に、GSH 付加体に特徴的なグルタミン酸の脱離に由来する 129 Da のニュートラルロスが観測された (m/z 301)。以上の結果から、本反応により生成した代謝物は、2-glutathionyl-3-nitropyridine であると推定した。

第三節 GST 依存的な 2-glutathionyl-3-nitropyridine の生成

第二節で構造推定した 2-glutathionyl-3-nitropyridine の生成における GST の関与を確認するために、まずラット肝ミクロソーム非存在下で 2-chloro-3-nitropyridine と GSH をインキュベーションしたところ、ラット肝ミクロソーム存在下と比較して 2-glutathionyl-3-nitropyridine

の生成率は5%と僅かであった。次に、ラット肝ミクロソーム存在下で GST の競合阻害剤として知られる glutathione sulfonic acid（最終濃度；20 mM）を添加し³¹⁾、インキュベーションを行った。その結果、2-glutathionyl-3-nitropyridine の生成は 72% 阻害され、2-glutathionyl-3-nitropyridine は化学的な求核置換反応によっても生成し得るが、その反応の大部分は肝ミクロソーム中の GST によって触媒されることが示唆された。

第四節 求核置換反応における置換基と位置の効果

GSH との求核置換反応における置換基と位置の効果を検討するため、種々の電子求引性及び電子供与性の置換基を導入した2-chloropyridine誘導体やそれらの位置異性体を用いて、ラット肝ミクロソーム中でインキュベーションを行った（Figure 17）。

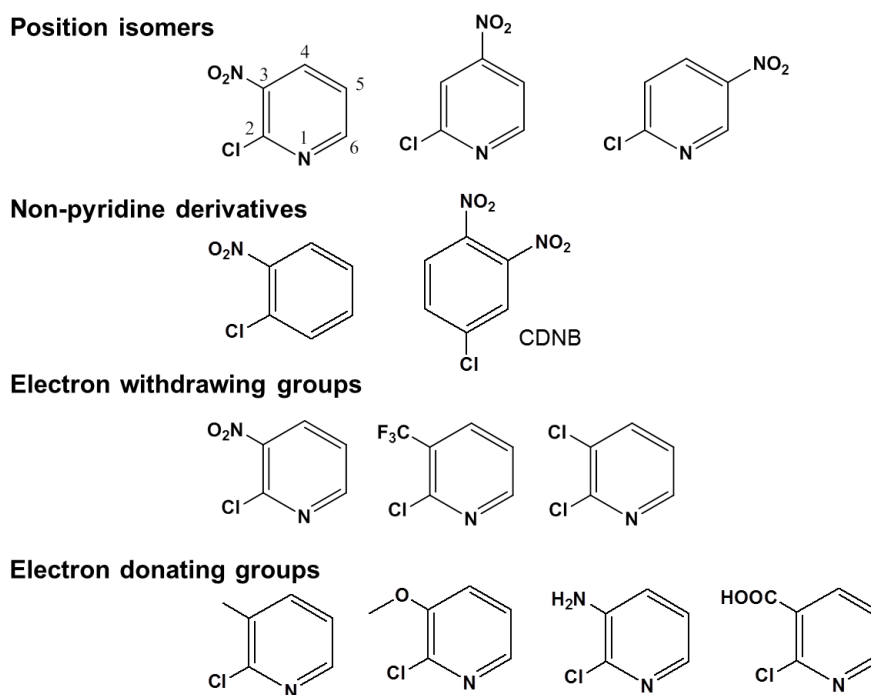


Figure 17 Structures of 2-chloropyridine derivatives used in this study

まず、GSH による求核置換反応が確認された 2-chloro-3-nitropyridine のニトロ基の位置異

性体を用いて、2-chloropyridine における置換基の位置効果を検討した。実験に供した位置異性体は、3 位、4 位、あるいは 5 位がニトロ化された 2-chloropyridine 誘導体である。また、GST の代表的な基質である chlorodinitrobenzene (CDNB)^{19,20,21,24,25,27,29)} を陽性コントロールとして用いた。ピリジン構造の要求性を確認するために、ベンゼン環上に塩素原子とニトロ基を持つ 1-chloro-2-nitrobenzene を用いた。これらの基質とラット肝ミクロソーム中の GST との反応速度を Table 5 に示した。反応速度は、基質の減少速度 (nmol/min/mg) とした。

Table 5 Activity of microsomal GST in rat liver microsomes toward 2-chloronitropyridine derivatives

Compound	Activity (nmol/min/mg)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
1-chloro-3,4-dinitrobenzene (CDNB)	306 \pm 12	12.1
2-chloro-3-nitropyridine	236 \pm 8	19.6
2-chloro-5-nitropyridine	137 \pm 5	16.0
2-chloro-4-nitropyridine	11.5 \pm 1.0	24.8
1-chloro-2-nitrobenzene	6.8 \pm 1.1	24.6
2-chloropyridine	< 2	39.6

Incubation mixture consists of 1 mg protein/mL, 5 mM GSH, 3 mM magnesium chloride and 1 mM substrate in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Incubations were conducted at 37°C for varying durations (1-40 min). Activities represent the depression rate of the substrate and are expressed as nmol/min/mg. ΔG^\ddagger represents a change in Gibbs free energy between a transition state generating Meisenheimer complex and an initial state (thiolate anion and the substrate).

典型的な GST の基質である CDNB の代謝活性は 306 nmol/min/mg-protein となり、本試験で用いた肝ミクロソームは十分な GST 活性を示した。同一条件下、3 種の位置異性体のうち 2-chloro-3-nitropyridine に対する活性は、検討した 3 種の位置異性体間で最も高く (236 nmol/min/mg protein)、次いで 5 位、4 位異性体の順となった。反応速度において、4 位異性体は 3 位異性体の約 20 分の 1 であり、ニトロ基の置換位置の効果が明確に観察された。また、ピリジン環をベンゼン環に置き換えた 1-chloro-2-nitrobenzene では、対応するピリジン誘導体である 2-chloro-3-nitropyridine に比べて反応速度が著しく遅く、ピリジン構造の要求

性が示唆された。一方、ニトロ基の存在しない 2-chloropyridine ではほとんど反応が進行しないことから、2-chloropyridine 誘導体では塩素原子に隣接する 3 位にニトロ基が存在することが、GST の基質性を向上させる因子であることが示唆された。

以上のように、2-chloronitropyridine 誘導体では、ニトロ基の位置効果が観察され、GST による求核置換反応が最も進行したのは 2-chloro-3-nitropyridine であった。

Table 6 Reactivity of 2-chloropyridine derivatives and Δ Gibbs free energy

Substituent	Activity (% of control)	ΔG^\ddagger (kcal/mol)
Nitro (NO ₂)	100	19.6
Trifluoromethyl (CF ₃)	31	30.0
Chloro (Cl)	26	33.9
Methoxy (MeO)	17	40.8
Methyl (Me)	14	40.9
Hydroxy (OH)	<5	32.6
Amino (NH ₂)	<5	39.7

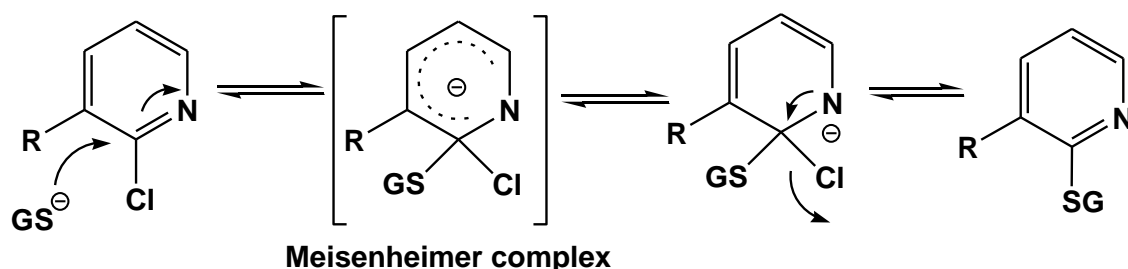
Incubation mixture consists of 1 mg protein/mL, 5 mM GSH, 3 mM magnesium chloride and 50 μ M substrate in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Incubations were conducted at 37°C for 30 min. Activities represent the percentages of decrease of the substrate relative to control samples that were incubated without liver microsomes. ΔG^\ddagger represents the change in Gibbs free energy between a transition state generating Meisenheimer complex and the initial state (thiolate anion and the substrate).

次に、位置効果の最も高かった 3 位の官能基を種々置換した 2-chloropyridine 誘導体を用いて、置換基効果を検討した (Table 6)。その結果、GSH と 2-chloropyridine 誘導体間の求核置換反応が最も認められた置換基はニトロ基 (NO₂) であり、次いで、トリフルオロメチル基 (CF₃)、塩素 (Cl)、メトキシ基 (MeO)、メチル基 (Me) の順に活性が高く、アミノ基 (NH₂) 及びヒドロキシル基 (OH) ではほとんど反応が進行しなかった。これは 3 位に導入した置換基の電子求引性の高さに応じた結果となっており、3 位の官能基の電子求引性が高いほど GST による求核置換反応が起こりやすいことを示唆していた。電子供与性の官能基であるアミノ基及びヒドロキシル基で反応がほとんど進行しなかった理由は、これらの

官能基が 2 位における求電子性を減弱させたためと考えられた。このように、3 位の官能基が有する化学的性質が、GST による 2-chloropyridine 誘導体への求核置換反応性に影響を及ぼすことが判った。

以上、2-chloropyridine 誘導体を用いて検討した官能基の位置効果と置換基効果の結果から、ピリジン環上の 3 位に電子求引性の官能基が存在する場合、microsomal GST による求核置換反応が進行しやすいことが明らかとなった。GST は求電子性の基質に GSH を転移する反応を触媒するため、これらの官能基の位置と種類が 2-chloropyridine 誘導体の 2 位における求電子性に影響を与えたと考えた。次に、GST の反応機構を分子軌道計算によってモデル化し、得られた結果と相関が認められる因子を検討することとした。

第五節 分子軌道計算と推定反応メカニズム



Scheme 2 Reaction mechanism of aromatic substitution reaction with GSH and 2-chloropyridine derivatives

GST による GSH 付加反応は、Meisenheimer complex を経由すると考えられる (Scheme 2)。ここでは、第四節で得られた置換基効果を分子軌道計算法によりモデル化し、反応性の違いをより理論的に解析した。その結果、2-chloropyridine と求核試薬の反応には二段階の遷移状態があると考えられ、Meisenheimer complex の生成が律速段階と推測された (Figure 18)。

反応性に影響を与えるパラメータを種々検討した結果、得られた GST の活性値と Meisenheimer complex 形成時の Gibbs free energy 変化 (ΔG^\ddagger (kcal/mol)) との間に逆相関が認められた (Table 5 及び Table 6)。すなわち、 ΔG^\ddagger の大きい誘導体ほど GSH との反応性が低

く (eg. 2-chloropyridine ; $\Delta G^\ddagger=39.6$)、 ΔG^\ddagger の小さいものほど反応性が高い (eg. 2-chloro-3-nitropyridine ; $\Delta G^\ddagger=19.6$) というモデルが得られ、 ΔG^\ddagger の大小によって反応性の差異を説明できることが判明した。

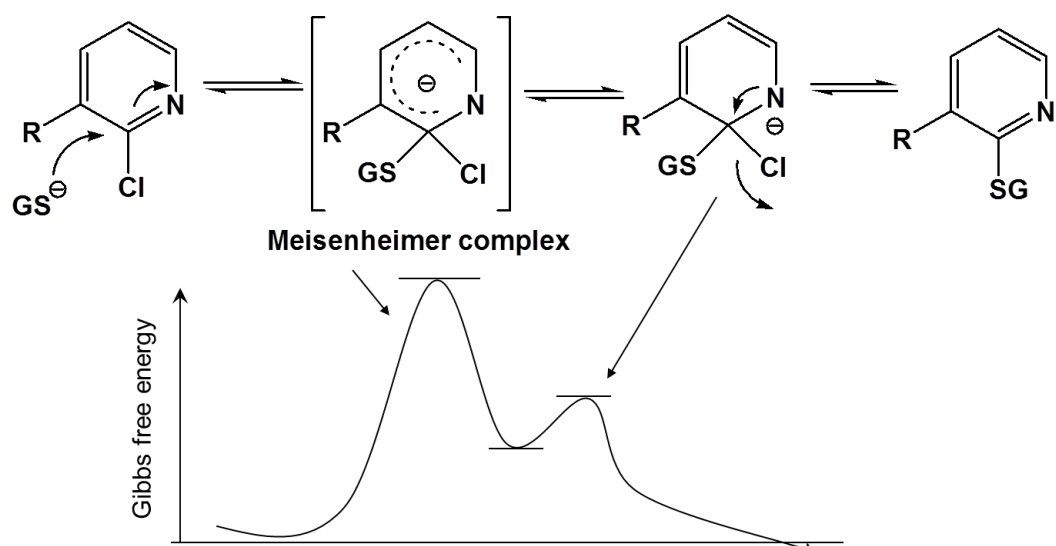


Figure 18 Proposed changes in Gibbs free energy related to the proposed reaction scheme between GSH and 2-chloropyridine derivatives catalyzed by rat microsomal GST.

第六節 結果の考察

本研究では、2-chloropyridine 誘導体が芳香族求核置換反応により新規 GSH 付加体を生成することを明らかにした。さらに、種々の 2-chloropyridine 誘導体を用いて、反応性に影響を与える置換基の種類や位置に関する相関研究を行い、実測したデータに基づき計算によるモデル化を行った。一般に、GST による反応機構については、まず GSH のチオール基をチオレートアニオン化すること、次いでチオレートアニオン化した GSH が活性中心で求電子性物質と反応する 2 段階の反応経路で進行することが知られている。

本機構については、可溶性画分の GST (cytosolic GST) で研究されており、GST は GSH をチオレートアニオン (GS^-) とした後、基質との間で負電荷の四置換中間体である σ -complex あるいは Meisenheimer complex の形成を触媒しており、これら complex の形成が律速段階で

あると報告されている^{20,21,24,25,26,29)}。ハロゲン化ベンゼン誘導体を用いた芳香族求核置換反応に関する研究によると、官能基の電子求引性に関連する Hammett σ が GST の反応速度と相関するため²⁸⁾、ハロゲン化ピリジン誘導体においても官能基の電子求引性や結合位置が GST の抱合活性に影響を及ぼすと推測した。本研究では、同様の反応機構を有する rat microsomal GST の代謝活性を利用し²⁸⁾、様々な官能基や置換位置を持つ 2-chloropyridine 誘導体を評価することにより、microsomal GST の基質性、つまり薬物の求電子性に起因する構造的特徴を解明することができた。今回得られた結果から、2-chloropyridine 誘導体においては、3 位に電子供与性の官能基を導入することにより、2-chloropyridine 誘導体の 2 位の求電子性を減弱することができ、GSH による求核置換反応を受けにくい構造に導くことができると考えられた。

芳香族化合物における GSH との求核置換反応は、一般的に σ -complex あるいは Meisenheimer complex を経由すると考えられている^{20,21,23,24,25,26,29,30)}。更に、2 位が置換された 3-nitropyridine あるいは 5-nitropyridine は、強アルカリ性の溶液中でアルカリ加水分解する際に Meisenheimer complex が形成される²²⁾。本研究で検討した 2-chloropyridine 誘導体の求核反応は GST で触媒される反応であるが、この場合においても、Meisenheimer complex が形成されると予想され、塩素原子が脱離基となって 2-glutathionylpyridine 誘導体に変換されると考えられた。本代謝反応について軌道計算を行なったところ、rat microsomal GST による 2-chloropyridine 誘導体における GSH との抱合代謝活性は、計算化学的に算出された Meisenheimer complex 生成時の Gibbs free energy 変化と逆相関することが判明した (Table 5 及び Table 6)。これまでに、GST の基質性に対する定量的構造活性相関 (QSAR) 解析は多数報告されている。例えば、Keen らは、GST の抱合活性と置換基の Hammett 値に相関があることを報告している²⁶⁾。また、可溶性画分の GST4-4 に関する解析では、4 位が置換された 1-chloro-2-nitrobenzene との反応性は導入された置換基の Hammett 値とよく相関するが、2 位が置換された 1-chloro-4-nitrobenzene 置換体では相関しないことが報告されている^{32,33)}。また、Rietjens らは、フロンティア軌道理論に基づく計算により非占有分子軌道の最低エネ

ルギー (E_{lumo}) を算出し、 E_{lumo} が GST による GSH 抱合反応における V_{max} と関連することを報告している³⁰⁾。これらの報告に基づけば、本研究で得られた ΔG^\ddagger と置換基の Hammett 値は関連すると考えられ、電子求引性の置換基ほど GST による求核置換反応が進行するという今回の結果は妥当であると考えた。元来、ピリジン環自体は電子欠乏性の芳香環であり、特に 2 位、4 位及び 6 位の電子欠乏性が高い。今回検討した 2-chloropyridine 誘導体の場合、3 位に電子求引性の官能基が導入されると 2 位の電子欠乏性（求電子性）が増大すると考えられ、この結果に基づけば、2 位がハロゲン化されたピリジン誘導体において、より求電子性の低い構造への変換に有効な情報が得られた。

以上、2-chloropyridine 誘導体において、芳香族求核置換反応が rat microsomal GST で触媒されることを初めて明らかとし、化学的性質が異なる種々の官能基及びその結合位置が GST の基質性に与える影響を調べ、計算化学的手法により GST による GSH 抱合反応をモデル化した。今回検討した 2-chloropyridine 誘導体の求核置換反応は、GST 阻害剤を用いた検討からその大部分が GST 要求性であった。しかしながら、肝臓中の GSH が枯渇するような状態では、もはや GST が本来の解毒機能を発揮することはできず、その場合には化合物の求電子性に応じて生体のタンパク質と共有結合し、最悪の場合、当該タンパク質の機能が損なわれ肝障害が惹起されることも考えられる。実際、2-chloropyridine と比較してハロゲン原子が異なるだけの 2-fluoropyridine 構造を部分骨格として有する医薬候補品をラットに投与したときに、血漿タンパク質への共有結合を経験しており、このときに GSH 枯渇状態にあったかは不明であるが、この化合物の 2-fluoropyridine 部分構造を相対的に電子リッチな fluorobenzene 骨格へ変換することによってこの結合は回避できており、本研究で得た結果と一致すると考えられる（社内データ）。本研究においてモデル化合物として用いた 2-chloropyridine 誘導体に比べ、医薬候補品では分子量が大きく複雑な構造を有するため、Meisenheimer complex を生成する時の Gibbs free energy 変化を計算化学的に算出する場合、多大な時間を要すると考えられる。実際の創薬において、ハロゲン化ピリジンが単体で薬物として使用される訳ではなく、医薬候補品の部分構造として用いられると考えられるが、

本研究で得た知見は、2-ハロゲン化ピリジンを部分骨格として持つ薬物の合成において、官能基の位置や性質を考慮するための有用な情報となると考えられる。ピリジン構造は医薬品の重要な部分構造の一つであり、本研究で見出したハロゲン化ピリジン誘導体の求電子性に起因する構造解明によって、より安全性の高い薬物への最適化研究に有益な知見を得ることができたと考えられる。

第三章 [³⁵S]Cysteine 及び [¹⁴C]cyanide を用いた反応性代謝物のトラッピング法の確立

第一節 序

毒性発現は、医薬品の市場撤退や医薬候補品の開発中止をもたらす大きな理由の一つである^{34,35)}。その中でも、特に反応性代謝物が原因と考えられるヒト特異体質性の毒性は、動物実験から予測することが困難で、発生頻度は低いが重篤化することが多く、troglitazoneのように上市後間もなく市場撤退を余儀なくされる例が多数報告されている^{36,37,38)}。製薬企業にとって、新薬を待望する患者に希望を与えるどころか、重大な副作用問題を引き起こすことは、自らの社会的立場を失墜しかねないリスクであり、従って反応性代謝物の生成を探索段階から評価し、重篤な毒性を回避するための十分な構造最適化を行うことはきわめて重要である。

第二章では、薬物自体が持つ求電子性を構造活性相関的に解析することで、生体高分子との共有結合の原因となる求電子性に起因する構造因子を解明した。そこで次に、より多様な構造を有する薬物群から、代謝により生成する求電子性の反応性代謝物を評価する方法論を確立することとした。CYP 等の通常の代謝酵素によって生成する反応性代謝物は、生体高分子と共有結合し、生体本来の機能を害すると考えられる。反応性代謝物は、第二章で検討した 2-chloropyridine 誘導体と同様に求電子性を呈し、求核性の官能基を豊富に有するタンパク質や核酸などの生体高分子と共有結合し得る。これに対する防御機構として、生体は求核性の低分子である GSH によって求電子性の反応性代謝物を無毒化し、体外へ排泄することができる。しかしながら、GSH との反応性が低い場合や GSH の枯渇するような状態では、GSH による解毒機構で排除しきれなかった反応性代謝物が生体高分子を不可逆的に修飾する。例えば、反応性代謝物を生成した CYP 自身に共有結合した場合、mechanism based inhibition を引き起こすことで酵素としての機能を不活化するため、薬物間相互作用の問題を生じる^{4,66)}。また、共有結合する相手が生体機能の維持に必須なタンパク質であった

場合には、重篤な毒性の原因となり得る^{34,40,41,42,43)}。代謝的活性化により生成する反応性代謝物は、古くから変異原性や発がん性の一因と考えられている。そのため、医薬品開発において代表的な遺伝毒性試験である Ames 試験では、操作過程に代謝的活性化が包含されており、そのリスクが評価されている。一方、反応性代謝物がタンパク質と共有結合した時の毒性の評価については、上記のように動物実験で捕らえることができないことも多く、ましてや低発現頻度のヒト特異体質性毒性を定量的に予測するための有効な手段は皆無である^{36,37,38)}。したがって反応性代謝物による毒性を回避するためには、構造最適化が可能な創薬初期段階においてその生成リスクを排除しておくことが、医薬品開発上きわめて重要である。

一般に反応性代謝物は化学的に不安定であるため、それ自体を検出することは困難なことが多い。また、反応性代謝物は、化学的反応性により soft または hard な求電子物質に大別される (Figure 19)。Hard and Soft Acids and Bases (HSAB) 則³⁹⁾に基づく、soft な求核基であるチオール基を持つ GSH や cysteine は、エポキシドや α,β -不飽和アルデヒドなどの soft な求電子物質を捕捉して付加体を形成する。一方、hard な求核試薬である cyanide やアミン類は、イミニウム中間体やアルデヒドなどの hard な求電子物質を捕捉する (Figure 19)。生成した付加体は化学的に安定となるため、反応性代謝物の化学的性質に合致した求核試薬を使用することで適切に捕捉することができ、HPLC での検出や LC/MS での構造解析が可能となる。また、化合物の中には soft と hard な反応性代謝物を同時に生成する事例が dihydrobenzoxathin 及び 2-(3-chlorobenzyloxy)-6-(piperidinyl)pyrazine で報告されており、これらから生成した反応性代謝物は、タンパク質への共有結合や遺伝毒性の原因となったと考えられている^{63,65)}。よって、網羅的に反応性代謝物を捕捉するためには、タイプの異なる求核試薬を併用する必要があると考えられる。

このような理由から、本研究では構造的に多様な医薬候補品の反応性代謝物生成を一元的に評価できる手法の開発を目的として、市販の [³⁵S]cysteine 及び [¹⁴C]cyanide を求核試薬として用いた反応性代謝物のトラッピング法を開発することとした。この評価法では、放射

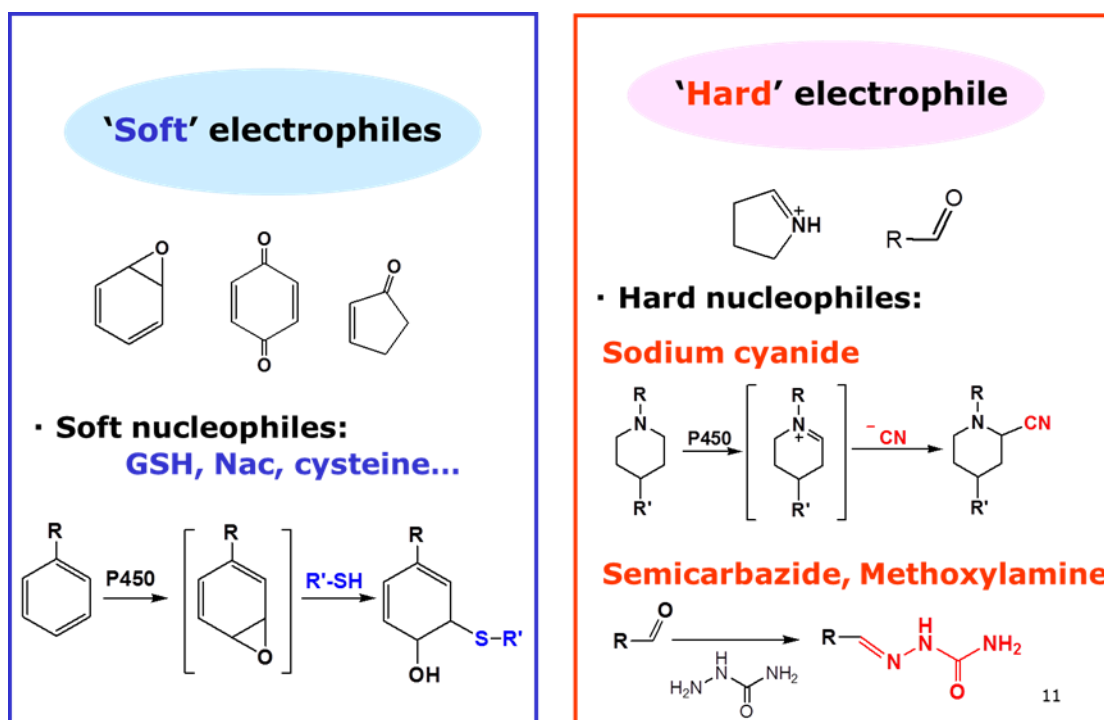


Figure 19 Nucleophiles for trapping electrophilic reactive metabolites

性同位元素で標識したトラッピング試薬と検体を肝ミクロソームなどの酵素源とインキュベーションすることによって、検体由来の反応性代謝物のみを放射性の付加体として定量することができ、さらにその構造を MS/MS 分析することで、反応性代謝物の構造情報を同時に取得できることが特徴である。加えて、soft な求核試薬である $[^{35}\text{S}]$ cysteine と hard な求核試薬である $[^{14}\text{C}]$ cyanide を共存させるため、前述の dihydrobenzoxathin のような soft と hard な反応性代謝物を同時に生成し得る化合物にも適用が可能になるなど、多くのメリットがある。また、本評価系で検出された反応性代謝物の定量値が、タンパク質との共有結合量と相関することを確認するために、放射性同位元素で標識した化合物を用いてタンパク質との共有結合試験も行い、両手法による定量値を比較することでこの評価系の有用性も検証することとした。

第二節 $[^{35}\text{S}]$ Cysteine 付加体の radio-LC/MS による構造推定

トラッピング法による反応性代謝物の新規定量法開発に着手したとき、cyanide は反応性代謝物の一種であるイミニウム中間体を捕捉し得る試薬としてよく知られていたが、cysteine には求核性のトラッピング試薬としての報告がほとんどなかった。そこで、cysteine の反応性代謝物に対する捕捉力を確認するために、GSH によって捕捉されることが知られている clozapine、diclofenac、*R*-(+)-pulegone 及び troglitazone から生成した反応性代謝物について、 $[^{35}\text{S}]$ cysteine によって捕捉することを試みた。すなわち、NADPH を添加したヒト肝ミクロソーム中で上記化合物をインキュベーションし、反応系に共存させた $[^{35}\text{S}]$ cysteine によって生成した付加体を、radio-LC/MS 分析にて評価した (Figure 20)。本検討では、未反応の $[^{35}\text{S}]$ cysteine が最初に溶出することで高バックグラウンドレベルを引き起こし、微量の反応性代謝物との付加体がノイズに埋もれてしまうことを回避するため、radio-LC/MS システムへの試料注入後 6.5 分間はカラムからの溶出液を radioisotope detector に導入せず、バックグラウンドの上昇を抑えることにした。

薬物非添加のコントロール (Figure 20 A、Control) では、保持時間 6.5~10 分付近に溶出した未反応の $[^{35}\text{S}]$ cysteine に由来するバックグラウンド以外に夾雑ピークはほとんど検出されなかった。同一条件における 4 化合物 (clozapine (B)、diclofenac (C)、*R*-(+)-pulegone (D) 及び troglitazone (E)) とのインキュベーションでは、ラジオクロマトグラム上に矢印で示したように、 $[^{35}\text{S}]$ cysteine との付加体と考えられるピークを検出した。次に、これらのピークについて、質量分析計による構造分析を行なった。得られたプロダクトイオンスペクトルを Figure 21 に、また各付加体に関する MS 情報を Table 7 に示した。

抗鬱薬である clozapine は、反応性代謝物としてニトレニウム中間体を生成すると考えられており、芳香環部分の 6 位と 9 位の GSH 付加体が報告されている^{48,52,54})。本検討では、clozapine の主要な cysteine 付加体は保持時間 39 分付近に認められ (Figure 20 (B))、プロトン付加分子として m/z 446 (+cysteine) が検出された。また、Figure 21 (A) に示すように、プロダクトイオンスペクトル中に、 m/z 302、359 及び 389 が認められ、cysteine は GSH 付加体と同様に、芳香環部分に結合しているものと考えられた。Clozapine は、この他に保持時

間 34 分に m/z 462 (+O+cysteine) 及び保持時間 39 分に m/z 444 (-2H+cysteine) の cysteine 付加体由来のイオンを与えた。

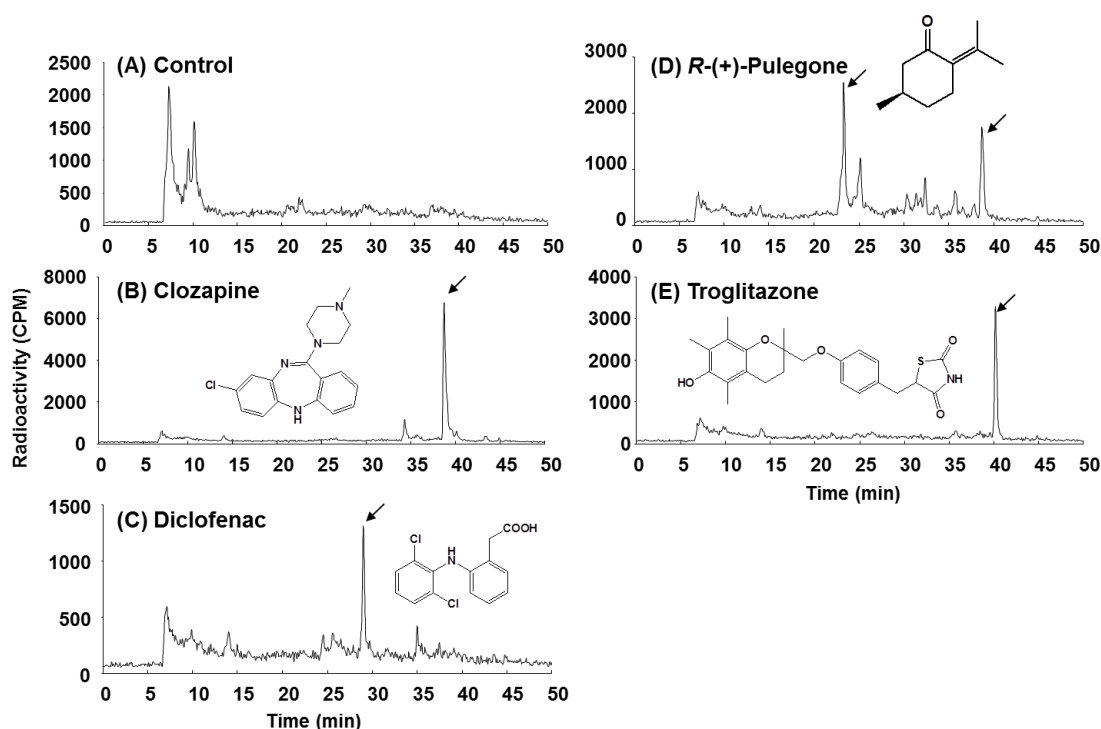


Figure 20 Representative radiochromatograms of four hepatotoxins incubated with $[^{35}\text{S}]$ cysteine in human liver microsomes

非ステロイド性抗炎症薬である diclofenac においては、ジクロロフェニル環上のエポキシドの生成、あるいはベンゼン環の水酸化による代謝的活性化が報告されている^{49,50,54}。 $[^{35}\text{S}]$ Cysteine トラッピングにおいて、diclofenac では保持時間 29 分付近に m/z 397 (+Cysteine-Cl+O) を含むピークが検出され (Figure 20 (C))、プロダクトイオンスペクトル中に m/z 290、315、333 及び 379 のプロダクトイオンが認められた (Figure 21 (B))。この付加体の生成においては、塩素原子の脱離が推測されたため、cysteine 分子はジクロロフェニル環に生成したエポキシドを捕捉したものと推測され、既存の GSH 付加体と同様の反応が進行しているものと考えられた。

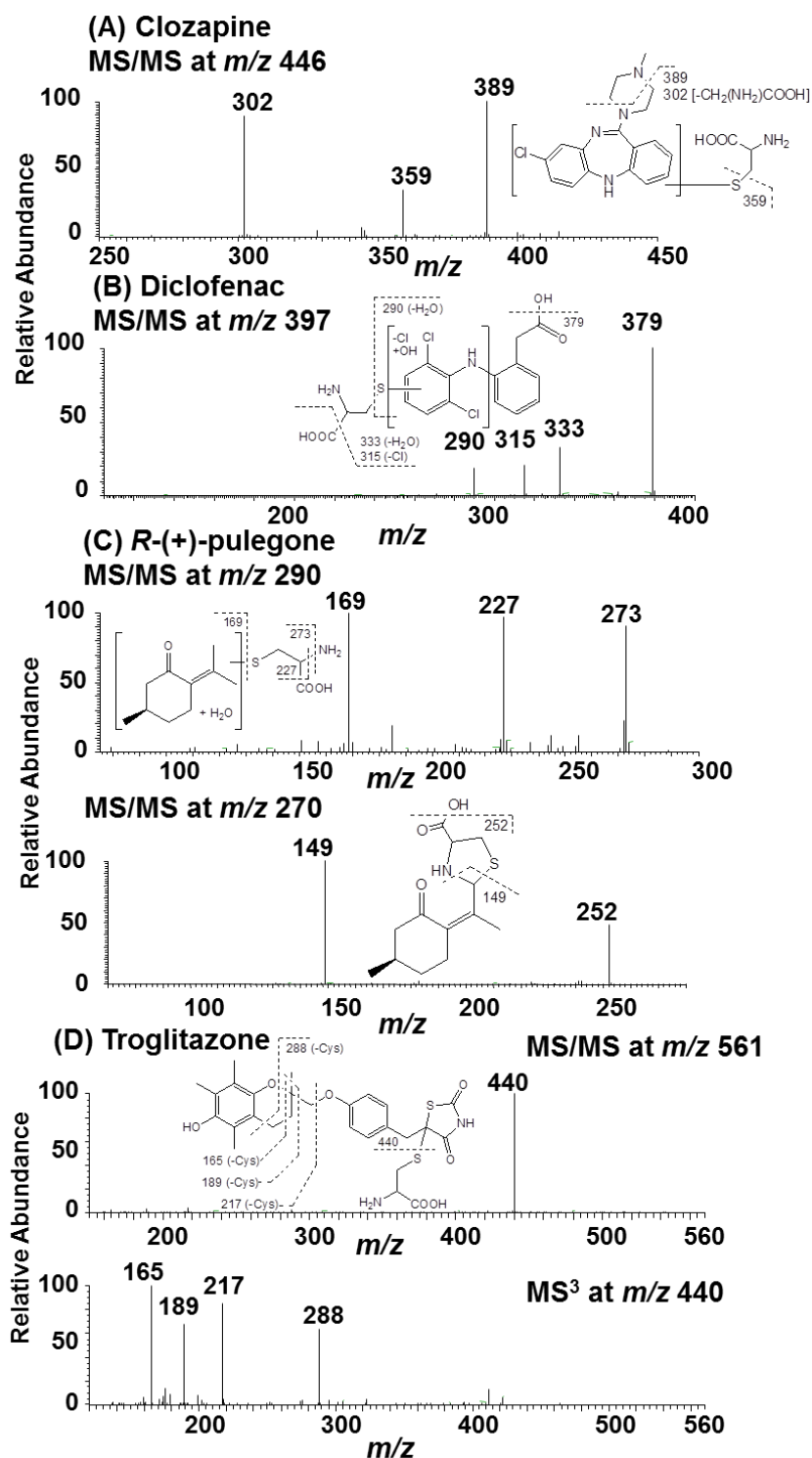


Figure 21 Mass spectra of cysteine conjugates generated from clozapine (A), diclofenac (B), *R*-(+)-pulegone (C), and troglitazone (D)

Table 7 Summary of retention times, mass spectral data and proposed compositions of cysteine adducts generated from clozapine, diclofenac, *R*-(+)-pulegone, and troglitazone

Compound (molecular ion, <i>m/z</i>)	Retention time (min)	[³⁵ S]Adduct (<i>m/z</i>) ^{a)}	Proposed composition ^{b)}	%ROI ^{c)}	Major product ions from MS/MS (<i>m/z</i>)	Major product ions from MS ³ (<i>m/z</i>)
Clozapine (327)	34	462	M+O+Cys	12.3	275, 362, 418, 444	-
	39	446	M+Cys	71.7	302, 359, 389	-
	39	444	M+Cys-2H	9.2	258, 270, 301, 355, 387	-
	40	446	M+Cys	6.9	-	-
Diclofenac (296)	29	397	M+O+Cys-Cl	100	290, 315, 333, 379	-
<i>R</i> -(+)-pulegone (153)	23	290	M+18+Cys	45.2	169, 227, 273	-
	25	-	-	24.9	-	-
	39	270	M+Cys-2H	29.9	149, 252	-
Troglitazone (442)	40	561	M+Cys	100	440	165, 189, 217, 288

a): Molecular ions of major radioactive components of the hepatotoxins were determined in positive ion mode.

b): M: molecular ion of the hepatotoxins, Cys: cysteine, Cl: chlorine, H: hydrogen, O: oxygen

c): Percent of region of interest in radiochromatogram

R-(+)-Pulegone は menthofuran 誘導体で、肝ミクロソームの反応によりエポキシドと γ -ketal 中間体が生成すると考えられている^{56,57)}。本検討において、クロマトグラム上に cysteine 付加体由来のいくつかの放射活性ピークが検出され、複数の反応性代謝物の存在が予想された (Figure 20 (D))。そのうち、ピーク強度の強い主要な 2 成分 (保持時間 23 分と 39 分) について、MS/MS 構造解析を行なった。その結果、Figure 21 (C) (上段) に示すように、23 分の放射活性成分は *m/z* 290 (+18+Cysteine) にプロトン付加分子を与え、プロダクトイオンスペクトル中に、*m/z* 169、227 及び 273 のプロダクトイオンを与えたが、これらの情報のみから結合位置を絞り込むには至らなかった。一方、保持時間 39 分の成分は *m/z* 270 にプロトン付加分子が認められ、プロダクトイオンスペクトルから、Figure 21 (C) (下段) に示すようなチアゾリジン構造^{67,68)}を持つことが推測され、既存の報告にある γ -ketal 中間体の生成が示唆された。

Troglitazone は、抗肥満薬として上市後、肝毒性によって市場からの撤退を余儀なくされた薬物であるが、チアゾリジンジオン環、あるいはベンゾピラン環への代謝的活性化が知

られている^{51,52,64)}。 Troglitazone では、保持時間 40 分に主要な放射活性成分が検出され (Figure 20 (E))、 m/z 561 (+cysteine) にプロトン付加分子が観測された。また、プロダクトイオンスペクトル中に、cysteine に相当する 121 Da のニュートラルロスが観測され (m/z 440)、さらに MS³ スペクトル中に、troglitazone 構造由来のスペクトルが認められたことから、チアゾリジンジオン環に cysteine が結合しているものと推測した (Figure 21 (D))。この cysteine 付加体は、既報の GSH 付加体と同様の反応性代謝物を介して生成した構造であると考えられる。

以上の結果から、[³⁵S]cysteine は GSH と同様に、反応性代謝物のトラッピング試薬として十分な捕捉能力を保有していることを明らかにした。

第三節 共有結合試験と [³⁵S]cysteine/[¹⁴C]cyanide トラッピング試験の関係

共有結合試験と [³⁵S]cysteine/[¹⁴C]cyanide トラッピング試験の関係を検討するため、構造的に多様な 40 種類の化合物を用いることとした。トラッピング試験では、ラジオクロマトグラム上のピークエリアの総計を被検化合物の反応性代謝物量として算出した (Integrated area, Figure 20)。一方、共有結合試験では、ヒト肝ミクロソームに取り込まれた放射活性から、被検化合物の結合量 (pmol drug equivalent/mg liver protein) を求め、これを反応性代謝物量として、トラッピング法により得られた反応性代謝物量との関係を調べた (Figure 22)。両試験に共通の陽性コントロールとして、代謝的活性化機構とタンパク質への共有結合量が既知である diclofenac、clozapine 及び compound X を用いた^{45,55)}。

まず、[³⁵S]cysteine を単独で用いたトラッピング試験で得られた反応性代謝物量と、ヒト肝ミクロソームへの共有結合量の関係を調べたところ、Figure 22 (A) に示すように正の相関が認められた。このことから、[³⁵S]cysteine を用いたトラッピング法は、タンパク質への共有結合性を予測する有効なツールになることが判った。しかしながら、図中に ▲ で示した 11 個の被検化合物は、タンパク質への共有結合性が高いにも関わらず [³⁵S]cysteine と付加

体を生成せず、偽陰性となることが分かった。

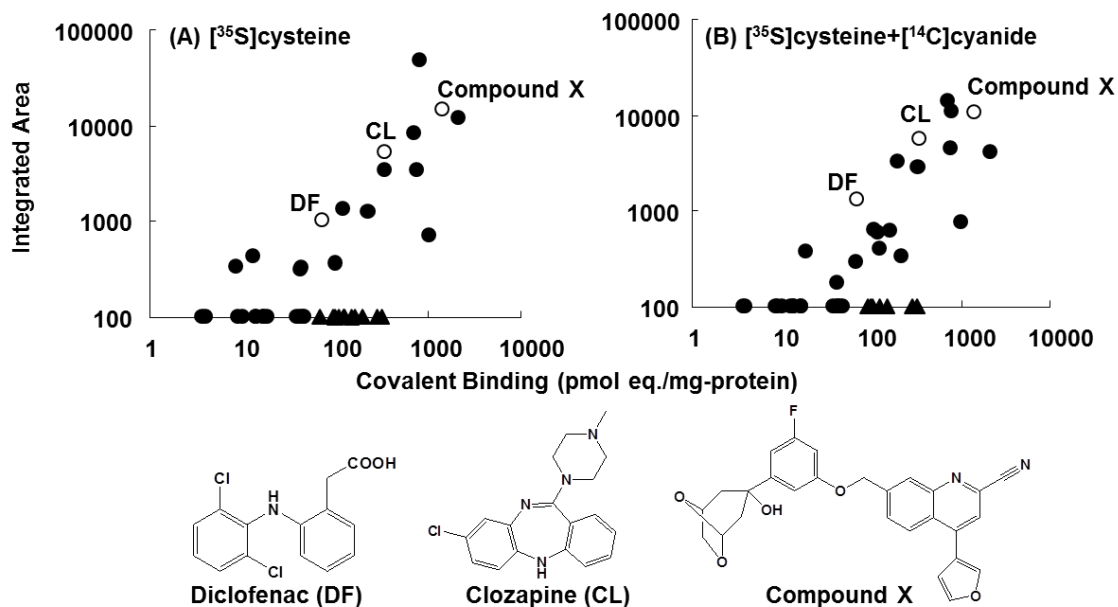


Figure 22 Relationships between extent of covalent binding and integrated area of radioactive components in trapping study with [35S]cysteine (A) or the combined trapping reagents ([35S]cysteine and [14C]cyanide, (B))

そこで、偽陰性化合物の構造を調べたところ、ピペリジン環やピペラジン環のような環状アミン構造を含んでおり、これらは[35S]cysteine では捕捉不可能なイミニウム中間体を反応性代謝物として生成しているのではないかと推測した(Figure 19)。Argoti⁵⁹⁾らにより、イミニウム中間体を生成する化合物群を用いた[14C]cyanide トラッピング試験とタンパク質への共有結合試験の結果に相関性が示されていることから、次に[35S]cysteine トラッピング試験の反応液に [14C]cyanide を共存させることとした。先に行った [35S]cysteine トラッピング試験で偽陰性となった化合物について、[35S]cysteine 及び[14C]cyanide 単独、あるいは2種類のトラップ試薬共存下で試験を行った。そのときに得られたラジオクロマトグラムの一例を Figure 23 に示す。本化合物では、[35S]cysteine 単独で放射活性成分は検出されなかったが (Figure 23 A)、[14C]cyanide 単独及び両トラップ試薬を共存させた場合にイミニウム中間体を捕捉したと考えられる放射活性成分を検出することができ (Figure 23 B 及び C)、トラッ

ブ試薬を共存させる有効性が明らかとなった。次いで、先に $[^{35}\text{S}]$ cysteine トラッピング試験を行った全化合物について、2 種のトラップ試薬共存下で再度試験を実施した。その結果、Figure 22 (B) に示すように、偽陰性と判定される被検化合物数が 11 個から 7 個に減少し、反応性代謝物のトラッピング法の性能を向上させることができた。

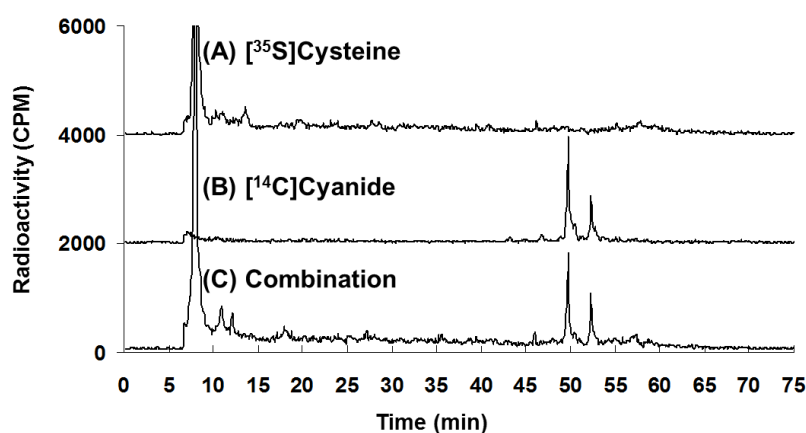


Figure 23 Radiochromatograms of a false-negative compound observed in the $[^{35}\text{S}]$ cysteine trapping assay.

第四節 結果の考察

本研究において開発した、 $[^{35}\text{S}]$ cysteine 及び $[^{14}\text{C}]$ cyanide の 2 種のトラップ剤を併用する反応性代謝物の新規定量/定性分析法は、従来法であるタンパク質への共有結合試験と良好な関係を示し、本法が創薬初期の最適化段階でタンパク質への共有結合性リスクを予測するためのきわめて有効なツールであることを証明した。

トラップ試薬として用いた $[^{35}\text{S}]$ cysteine は、GSH と同様にチオール基を有するため、反応性に富むエポキシドや α,β -不飽和アルデヒド、または Michael acceptor を捕捉できると推測される(Figure 19)。加えて、 $[^{35}\text{S}]$ cysteine は GSH と異なり GST の補酵素にならないため、定量値は捕捉された反応性代謝物の化学的反応性のみに依存すると考えられる²¹⁾。すなわ

ち、 $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ の代わりに $[^{35}\text{S}]\text{GSH}$ を用いた場合、反応性代謝物に化学的に結合して生成する付加体に、GST で触媒されて安定化する付加体相当分を加味することになり、生体内で起こるタンパク質との共有結合性を過大評価することになってしまう。そのような理由から、本研究では $[^{35}\text{S}]\text{GSH}$ ではなく $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ を用いて試験系を開発した。

反応性代謝物に対する $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ の反応性は、4 化合物 (clozapine、diclofenac、*R*-(+)-pulegone 及び troglitazone) を用いた検討において GSH と同等であることを明らかにした (Figure 20 及び Table 7)。一方、 $[^{14}\text{C}]\text{cyanide}$ で捕捉可能な反応性代謝物は、イミニウム中間体のような hard な反応性代謝物であり、求核試薬としての反応性については既に幾つかの報告がある^{60,61,62,63})。イミニウム中間体は、ピペリジン環、ピペラジン環やピロリジン環構造を代表とする環状アミン類から代謝的に生成するが、これらの構造は医薬品においてよく用いられることに加え、イミニウム中間体は $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ で捕捉できないため、 $[^{14}\text{C}]\text{cyanide}$ を用いたトラッピング試験の構築が別途必要になる。しかし、本研究では、反応性代謝物の化学的反応性に応じたトラップ試薬を併用することによって、1 回の試験でより正確に反応性代謝物の生成量、すなわち反応性代謝物による毒性リスクを評価することを可能にした。実際、これらのトラップ試薬がお互いの欠点を補完し合い、反応性代謝物のタンパク質に対する共有結合性を予測するツールになり得ることは、 $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ 単独の場合に偽陰性となった化合物群を適切に評価できたことで証明されている (Figure 22B 及び Figure 23)。

反応性代謝物が、重要な役割を担うタンパク質を不可逆的に修飾して本来の機能を損ね、臓器不全を起こし得ることは容易に推察できるほか、修飾されたタンパク質が抗原性を示し免疫系が活性化されるというハプテン仮説による毒性発現も提唱されている。これらの毒性発現に至る過程には、薬物と生体高分子との共有結合体生成量に、ある閾値が存在していると考えられる。そのため、従来の反応性代謝物の定量法である共有結合試験では、放射性同位元素で標識した薬物を合成し、肝ミクロソームなどの酵素源とインキュベーションするか、あるいは動物への投与後得られた肝臓や血漿からタンパク質を回収し、それ

らに残存する放射活性を測定することで、生体高分子との共有結合量を算出する⁴⁴⁾。この手法は、生体高分子に結合する反応性代謝物をもれなく捕捉できる点がメリットであるが、薬物を放射性同位元素で標識する労力と費用及び動物実験の必要性等の面から、探索段階の膨大な医薬候補品に適用することは不可能である。このような理由から種々のトラップ試薬を用いた *in vitro* の試験系が開発されてきた^{48,49,53,57,58,63)}。これらの方法では、いずれも非標識化合物とトラップ試薬を用いるため、反応性代謝物の構造情報を取得し、それを基に新たな候補品をデザインすることには有効な手段であるが、定量には不向きであった。遺伝毒性を除き、反応性代謝物による毒性評価系が皆無であるため、反応性代謝物を定量することにより、毒性リスクを予測・低減させる試みが世界中で行われている。例えば、ダンシル化した GSH をトラップ試薬に用いることで、反応性代謝物の付加体を蛍光化して定量評価する方法が報告されている⁴⁶⁾。しかしながら、被検化合物自身あるいは代謝によって蛍光を示す場合にはこの方法では評価不能であり、また、ダンシル基の分子サイズが相対的に大きいため、GSH 本来の反応性と異なることも推測される。これらの諸問題に対処するべく、^[35S]GSH によるトラッピング試験が報告された⁴⁷⁾。この手法では、期待通り共有結合試験との間に相関性のあるデータが得られているが、イミニウム中間体を捕捉する事ができないことや、^[35S]GSH が GST の補酵素になるため、先にも述べたように共有結合性リスクを定量的に評価するという点では、本酵素で触媒されて生成する付加体の分を過大評価することが課題と考えられる。このような背景からも、反応性代謝物の捕捉に市販品として安価に入手可能な^[35S]cysteine を用いることは、多種多様な化合物評価に有利となる。

本研究では、^[35S]cysteine 及び ^[14C]cyanide を同時に用いて、よりタンパク質への共有結合性を正しく評価できる方法の新規開発に取り組み、反応性代謝物の定量評価法として新たな方法論を構築した。^[35S]Cysteine ではほとんど知られていなかった反応性代謝物の捕捉力を確認し、この系の反応性代謝物の定量法としての妥当性を従来法である共有結合試験との相関性で検討した結果、代謝的活性化によって生じた共有結合性を適切に評価するこ

とができた。更に、トラッピング法からタンパク質への共有結合性を予測するという意味では、 $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ 単独ではタンパク質への共有結合に関わる反応性代謝物をすべて捕捉できるわけではなく、反応性の異なる求核試薬、すなわち $[^{14}\text{C}]\text{cyanide}$ と組み合わせることがきわめて有効であった。これによって、1回の試験で $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ 及び $[^{14}\text{C}]\text{cyanide}$ で捕捉され得る異なる化学的性質を持つ反応性代謝物を評価することができ、 $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ 単独の場合に比べ、共有結合性の予測をより精度良く行えるようにした。本法では、労力と時間のかかる検体の放射性標識化を必要とせず、多種多様な検体から生成する反応性代謝物を一元的に評価できるため、反応性代謝物の定量からタンパク質への共有結合性を予測するだけでなく、LC/MS との組み合わせにより構造最適化も可能な評価系を開発することに成功した。

結語

医薬品開発においては、代謝物の薬効や毒性を適切に評価する必要がある、ヒトで生成する代謝物を前臨床段階からの確に予想し、代謝物が持つ様々なリスクや特徴を薬物動態面から十分理解しておくことが重要である。一方、遺伝毒性試験を除き、反応性代謝物に起因する毒性を検出し予見する有効な *in vitro* 試験やモデル動物の欠如から、探索段階の最適化研究でその生成を最小にすることが望まれる。これらの目的において、LC/MS は迅速かつ高選択的に代謝物を検出することが可能なツールとして必要不可欠な装置であり、特に代謝物構造の特定に有効な精密質量分析計の必要性は益々高まっている。本研究では、精密質量分析計が保有する性能を駆使することで、動物における代謝物の網羅的解析や反応性代謝物・求電子性物質の構造解析を行い、得られた結果をヒト代謝物の推定に役立てるとともに、毒性発現リスクの低減に向け、種々の求電子性物質の反応性に関する考察や、創薬初期段階で有効な反応性代謝物の新規定量法を開発することを目的として研究を行った。

第一章では、抗がん薬として開発中の lenvatinib をサルに経口投与したときの試料中に見出された未知代謝物につき、精密質量分析計と NMR を用いて構造解析した。その結果、サルにおいて lenvatinib は主にクロロフェノキシ部分の脱離を伴ったキノリン部分への *S*-GSH 付加体 (*S*-置換体) と種々の *N*-cysteine 誘導体 (*N*-置換体) に変換されることが明らかとなった。キノリン環に対する *S*-GSH 付加体生成は、既報と同様に GSH の非酵素的な求核置換反応で進行したが、*N*-cysteine 誘導体への変換については報告例がなく、新規の代謝経路であることが判明した。本経路において想定した lenvatinib の代謝反応機構は、求核性官能基による分子間と分子内の連続的な二段階求核置換反応であり、*S*-置換体から *N*-置換体へ変換されたと推論した。この仮説を検証するため、複数の代謝物の構造同定や種々の cysteine 誘導体を用いて反応性を検討した結果、複雑かつユニークな代謝経路の全容解明に至った。すなわち、生体内では lenvatinib と GSH の反応により *S*-GSH 付加体が生成し、 γ -GTP によ

って *S*-GSH 付加体からグルタミン酸が脱離し *S*-cysteinylglycine 付加体となると、cysteine のアミノ基が速やかに分子内で求核置換反応して *N*-cysteinylglycine 付加体に変換され、最終的に DP により *N*-cysteine 付加体へ代謝されると考えられた。興味深いことに、生体内ではさらに代謝が進行し、*N*-置換体はジスルフィド結合による二量化、あるいは *N*-置換体のチオール基が未反応の lenvatinib に分子間求核置換反応して *N,S*-置換体を生成するに至るといふ、lenvatinib のきわめてユニークな代謝経路が判明した。本知見の中でも、*N*-置換体の生成と続く二量化に至る経路はフェノキシキノリン誘導体の代謝経路として報告が無く、きわめて興味深い。これらの代謝物は、ヒト臨床試験でも主要成分として検出されており、精密質量分析計を用いてサルの代謝物を精密にかつ網羅的に解析したことで、限られたヒト試料から代謝物に関する有益な情報を迅速に取得することができた。

第二章では、ピリジン誘導体において認められた新規芳香族求核置換反応について、microsomal GST の触媒活性を利用し、生体高分子との共有結合性にもつながりかねないピリジン誘導体の求電子性に起因する反応生成物の構造を推定した。本研究においては、GST の新規基質として見出した 2-chloropyridine 誘導体をモチーフに、GST の基質性に影響を及ぼす因子の探索を目的として種々検討し、ピリジン環の電子状態によって酵素活性が大きく変化することを明らかにした。求電子性の物質は、生体高分子と共有結合し、高分子本来の機能を阻害することで毒性を発現し得ると推察されるが、生体は GSH による抱合反応を解毒機構の 1 つとして機能させ、高分子への共有結合リスクを低減している。しかしながら、acetaminophen のように高投与量の薬物では、肝臓中の GSH が枯渇するほど多量の反応性代謝物が生成し、それによって恒常性が崩れ、肝障害を惹起することが明らかとなっている。探索段階では臨床投与量を推定することが困難なため、新規化合物を合成する前に GSH 抱合を受けやすい部分構造や、抱合反応に影響を与える置換基を予測することができれば、より安全性の高い構造への誘導化が可能となる。そこで、創薬研究において有用な部分構造の 1 つであるピリジン環のモデル化合物として 2-chloropyridine 誘導体を用いて GST の反応性に対する置換基の効果を検討するとともに、本反応を計算化学的にモデル化

した。反応性に対する置換基の効果では、ニトロ基などの電子求引性の官能基が 3 位に存在するときに GST の活性が最大化することが明らかとなった。本反応のモデル化においては、GSH のチオール基がチオレートアニオン化してハロゲン化ピリジンの求電子中心を求核攻撃し、GSH とハロゲンが一つの炭素に結合した四置換中間体である Meisenheimer complex を遷移状態として経由するものと考えた。遷移状態に至る際の Gibbs free energy 変化が GST の反応速度と逆相関したことから、2-chloropyridine 誘導体で観察された GST の反応性の違いを説明し得る重要な因子であることが明らかとなった。計算化学的手法では、実際に候補化合物を合成せずに、モデル化した定量的構造活性相関を基に、より求電子性の低い構造へ導くための官能基の種類や導入位置を種々デザインできることから、創薬初期における効率的な構造最適化に有効である。本研究により、ピリジン環における新規芳香族求核置換反応を明らかにするとともに、求核置換反応を受けるに至る求電子物質の化学的構造的因子を見出すことができた。

第三章では、より構造的に多様な薬物の求電子性や反応性代謝物の生成リスクを評価する新規方法論を確立するために、 $[^{35}\text{S}]\text{cysteine}$ 及び $[^{14}\text{C}]\text{cyanide}$ を求核試薬として用いたトラップング法に関する研究を行なった。本法では、求核試薬として GSH ではなく cysteine を用いることにより、GST の触媒作用に起因する過大評価の問題を克服できたと考えている。加えて、反応性の異なる求核試薬である $[^{14}\text{C}]\text{cyanide}$ を組み合わせることによって、GSH や cysteine が捕捉することができない hard な反応性代謝物であるイミニウム中間体も、1 回の試験で評価可能となり、より精度よく反応性代謝物による共有結合性を予測することができた点にこの方法の優位性がある。しかも、本法の特徴は、反応性代謝物を定量可能なことに加えて、化合物を放射性標識する必要がなく、LC/MS と組み合わせることで反応性代謝物の構造推定も同時に行なえることである。反応性代謝物は、生体高分子と共有結合することにより毒性を惹起すると考えられていることから、創薬段階で活用可能な汎用性とスループット性にも優れる本法を用いることで、反応性代謝物生成リスクを低減し、ベネフィットの最大化を目指した医薬品開発に貢献することができる。

以上、本研究では薬物代謝、特に求電子物質の酵素的または非酵素的な抱合反応にフォーカスして LC/MS による分析技術に基づいたアプローチを行い、新規代謝経路の発見や種々の反応性に関する新たな知見など、学術的に価値のある多数の結果を導くことができた。これらの知見は、いずれも医薬品の探索から開発研究、そして申請までの業務で活用できる有益な情報と考えられ、今後の創薬研究の推進に役立つものと期待される。

謝辞

本論文の作成に際し、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました東北大学病院教授・薬剤部長（東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野 教授）眞野成康博士に謹んで感謝申し上げます。

また、本論文の審査に当たりまして、有益なご助言とご校閲を賜りました東北大学大学院薬学研究科 生命解析学講座 臨床分析化学分野 教授 大江知行博士、同薬物動態学分野 准教授 吉成浩一博士に深く感謝いたします。

また、本研究の機会を与えていただいたエーザイ株式会社 内藤晴夫代表執行役社長、林秀樹代表執行役副社長、BA プレジデント 菅沼彰純博士に厚く御礼申し上げます。

本研究に当たり、終始的確なご助言とご指導を賜りました、エーザイ株式会社 吉村 勉博士、草野一富博士、福田勝行博士に謹んで感謝申し上げます。また、反応性代謝物に関する研究において、適切なご指導を賜りました旧万有製薬株式会社 石井康行博士、千葉雅人博士、大江知之博士に厚く感謝申し上げます。本研究の遂行に当たり、ご助力とご指導を賜りました エーザイ株式会社 浅井直樹博士ならびに水尾 均主幹研究員、旧万有製薬株式会社 相良 武博士、柴田芳宏博士、森 健一博士ならびに高橋宏幸博士に謹んで感謝申し上げます。

代謝物構造解析研究を通して、研究を深く理解し、常に的確なご助言と激励をいただきましたエーザイ株式会社 川口晋紀主任研究員と石田知己博士に厚く御礼申し上げます。また、最後になりましたが、エーザイ株式会社 筑波研究所 薬物動態室の皆様、旧万有製薬株式会社 つくば研究所 薬物動態研究室の皆様、研究を精神面から支えてくれた家族に心から感謝申し上げます。

実験の部

第一章付属実験

実験材料

^{14}C で放射標識した lenvatinib mesylate ($[^{14}\text{C}]\text{E7080}$, 4-[3-chloro-4-(*N*'-cyclopropylureido)phenoxy]7-methoxy (2- ^{14}C) quinoline-6-carboxamide mesylate) は、GE healthcare (Chalfont St. Giles, UK) で合成した。比放射活性は 59 mCi/mmol、放射化学的純度は試験期間中 99%以上であった。非放射標識化 lenvatinib mesylate は FUJIFILM Finechemicals (Fukushima) で合成した。還元型 GSH、*S*-methylcysteine、ammonium acetate 及び *N*-acetyl cysteine は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。L-Cysteine、acetonitrile 及び methanol は和光純薬工業株式会社 (Osaka) から入手した。液体シンチレーター及び ULTIMA-Flo M は PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Waltham, MA) から入手した。Cynomolgus monkey liver S9、SD rat liver S9 及び pooled human liver S9 は XenoTech, LLC (Lenexa, KS) から購入した。

Cynomolgus monkey への経口投与とサンプル採取

本研究における動物実験は、ヒューマンサイエンス振興財団動物実験実施施設認定を取得した施設で行なった。試験計画書はエーザイ動物実験委員会の承認を受け、試験はエーザイの各種動物実験規定に従い行った。サルへの投与液は、適量の非放射標識化 lenvatinib mesylate を 3 mM hydrochloric acid に溶解し、適量の $[^{14}\text{C}]\text{lenvatinib mesylate}$ (8.878 MBq/2.143 mg/mL の 3 mM hydrochloric acid 溶液) 溶液と混合して、3 mg/1.27 MBq/mL の lenvatinib 溶液として調製した。調製した lenvatinib の投与液を、雄性 cynomolgus monkey (n=1) に 30 mg/12.7 MBq/kg で 1 日 1 回、投与第 1 日目、2 日目及び 4 日目の計 3 回投与した。第 1 日目の投与後から尿と糞を 3 日間採取した。実験に用いたサルは、最終投与 (投与第 4 日目)

後 4 時間で安楽死させ、血液、胆嚢胆汁及び肝臓を採取した。血液は、抗凝固因子としてヘパリンナトリウムを含むチューブに採取し、遠心分離（1880 g、10 分、4°C）後、血漿を得た。肝臓には 2 倍量の氷冷水を添加し、4°C で Physcotron™ homogenizer を用いて均一にホモジナイズした。得られたすべての試料は、使用するまで -80°C で保存した。

Radio-LC/MS Analysis 分析用の試料調製

血漿及び肝臓ホモジネート中の放射活性成分は、試料に 1/10 倍量の 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) を加えた後、2 倍量のメタノールで抽出した。メタノール抽出液は、窒素ガス気下 37°C で乾固し、残渣を 50% メタノール水で再溶解した後、遠心分離（13200 g、10 分、4°C）し、その上清を radio-LC/MS 分析に供した。尿は、遠心分離（13200 g、10 分、4°C）後の上清を radio-LC/MS 分析に供した。胆嚢胆汁は、10 倍量の蒸留水で希釈し、遠心分離（1880 g、10 分、4°C）後の上清を radio-LC/MS 分析に供した。

Radio-LC/MS 分析

Radio-LC/MS（精密質量分析計）システムは、Synapt G2 HDMS（Waters、Milford、MA）、Acquity UPLC system（Waters）及び radioisotope detector（Radiomatic 625 TR : PerkinElmer Life and Analytical Sciences）で構成した。質量分析条件は、Capillary voltage : 3.2 kV、Source temperature : 120°C、Desolvation temperature : 400°C、Cone gas flow : 50 L/hr 及び Desolvation gas flow : 800 L/hr である。精密質量分析計:SynaptG2 HDMS は、90%イソプロパノール水溶液に溶解した 10 mM ギ酸ナトリウムを infusion した際に生成するクラスターイオンで、測定に使用する質量範囲 (m/z 100-1500 Da) をキャリブレーションした。マスペクトルは positive ion mode で取得し、継続的に外部標準（0.5 ng/mL ロイシンエンケファリン、 m/z 556.2771、流速 50 μ L/min で 10 秒に 1 回 infusion）で補正し、自動的にセントロイド化した。フルスキャン測定は、質量範囲 m/z 100-1300 Da で行った。生体試料（尿、胆嚢胆汁、血漿抽出液及び肝ホモジネート抽出液）は、LC/MS システムへの 1 回のインジェクションで、

いずれも約 40000-50000 dpm の放射活性を導入できるように調製した。分析カラムは Atlantis T3 (5 μ m、4.6 \times 150 mm HPLC column、Waters) を用いた。クロマトグラフィーは、溶媒 A : 10 mM 酢酸アンモニウム及び 0.05% のギ酸を含む水溶液、及び溶媒 B : 10 mM 酢酸アンモニウム及び 0.05% ギ酸を含む 90% アセトニトリル水溶液を用いて、流速 1 mL/min で行なった。グラジエントは、カラムを 100% A で平衡化させた後試料をインジェクションし、最初の 5 分間で 5% B、次の 10 分間で 15% B、さらに次の 35 分間で 50% B まで直線的に上昇させ、その後 1 分間で 90% B まで上昇させ、90% B を 14 分間維持させる条件で行った。試料注入後の分析カラムからの溶出液は、radioisotope detector と質量分析計に 4 : 1 の容量比で導入した。ラジオクロマトグラムは、前述のカラムからの溶出液と液体シンチレーター (ULTIMA-Flo M) を、それぞれ流速 0.8 mL/min と 1.6 mL/min で混和して得た。マススペクトルデータは MassLynx software (ver. 4.1、Waters) で取得し、データ処理を行なった。Radioisotope detector は ProFSA software (ver. 3.3.12.79、PerkinElmer Life and Analytical Sciences) で制御した。

尿中代謝物の分離

尿中主要 3 成分 (代謝物 C1、C3 及び C4) は、単離精製用の HPLC で分離した。分離システムは、LC-10AD VP ポンプ、SIL-HTC オートサンプラー、SPD-10A VP PDA、DGU-14A degasser 及び CTO-10AC VP カラムオーブン (Shimadzu) で構成した。代謝物の粗精製はグラジエント条件で行い、移動相は、溶媒 A : 0.1% ギ酸水溶液と溶媒 B : 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液を用いた。分析カラムは Atlantis T3 (10 \times 250 mm preparative HPLC column、5 μ m、Waters) を用い、流速 4 mL/min で送液した。グラジエントは、分析カラムを 100% A で平衡化させた後試料をインジェクションし、最初の 5 分間で 10% B、次の 20 分間で 20% B、さらに次の 5 分間で 100% B まで直線的に上昇させ、その後 5 分間 100% B を維持した。HPLC からの溶出液を 336 nm の UV でモニターし、目的物を回収した。得られた各分離画分は、分析カラムとして Atlantis T3 (4.6 \times 150 mm、5 μ m、Waters) を用いた Synapt G2/UPLC シス

テムで分析し、目的のプロトン付加分子である m/z 293.0591 (代謝物 C1)、 m/z 641.1483 (代謝物 C3) 及び m/z 698.1697 (代謝物 C4) を確認し、各代謝物を含む画分を得た。得られた画分は窒素ガス気下濃縮乾固した。得られた残渣は 30% アセトニトリル水溶液で再溶解し、遠心分離後 (13200 g 、10 分、4°C) の上清を、Atlantis dC18 カラム (4.6 \times 150 mm、3 μ m、Waters) にインジェクションし、流速 1 mL/min でクロマトグラフィーした溶出液を 336 nm の UV でモニターし、次に示す条件で更に精製を行なった。代謝物 C1 の精製は、10% B の条件で行った。代謝物 C3 及び C4 の精製は、10% B でカラムを平衡化させた後試料をインジェクションし、10 分間で 100% B まで直線的に上昇させ、その後 2 分間 100% B を維持することにより行った。得られた分離画分は、Synapt G2/UPLC system で分析し、目的の代謝物 C1、C3 及び C4 を含む各画分をそれぞれ凍結乾燥し、得られた残渣を NMR 分析に供した。分離精製した代謝物 C1、C3 及び C4 の量は、それぞれ 34、41 及び 134 μ g であり、この時の純度は、それぞれ 90%、95%以上及び 80%であった。

NMR 分析

代謝物 C1、C3 及び C4 の構造は、一次元あるいは二次元 NMR で分析した。得られたすべての NMR データは、5-mm z-gradient indirect detection probe を搭載した Unity INOVA 500 MHz NMR spectrometer (Varian、Palo Alto、CA) にて取得した。Lenvatinib と分離した代謝物 C1、C3 及び C4 は、約 0.6 mL の methanol- d_4 に溶解した。一次元プロトン NMR と二次元 COSY (Correlation Spectroscopy) 及び NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) をそれぞれの試料について取得した。プロトンの化学シフトは、内因性のメタノールの 3.30 ppm で補正した。すべての測定は 30°C で行なった。

インキュベーション条件

Lenvatinib は、10 mM DMSO 溶液として調製した。Lenvatinib の GSH 抱合代謝に対する酵素の寄与を検討するために、GSH (5 mM) と lenvatinib (50 μ M) 及び 2 mg/mL liver S9 (SD

rat, cynomolgus monkey あるいは human) を含む 0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.4) 液を調製し、NADPH 存在あるいは非存在下、0、15、30 及び 60 分間、37°C でインキュベーションを行なった。Lenvatinib に対する各種求核剤の反応性を検討するためには、lenvatinib (50 μ M) と 5 mM の各求核試薬 (GSH、Nac、L-cysteine 及び *S*-methyl cysteine) を 0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.4) に加え、0、30、60 及び 120 分間、37°C でインキュベーションした。いずれの反応とも、インキュベーション容量と等量の 5% ギ酸含有のアセトニトリル/メタノール=2/1 (v/v) 溶液で反応を停止させた。各試料を遠心分離後 (13200 g、10 分、4°C)、LC/MS システム (Quantum/Accela、ThermoFisher Scientific、Waltham、MA) で分析を行なった。クロマトグラフィーに際し、分析カラムとして Acquity 2.1 \times 100 mm (1.7 μ m BEH column、Waters) を用い、流速 0.5 mL/min で、移動相 A : 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液及び移動相 B : 10 mM 酢酸アンモニウム 90% アセトニトリル水溶液を用いた。グラジエントは、100% A でカラムを平衡化させた後試料をインジェクションし、最初の 5 分間で 50% B まで直線的に上昇させ、次の 1 分間で 100% B まで上昇させ、その後 2 分間 100% B を維持した。Lenvatinib は、プロトン付加分子の m/z 427 から生成する m/z 202、312 及び 370 のプロダクトイオンを確認することで検出した。Lenvatinib が求核試薬との求核置換反応によって生成すると考えられる GSH、Nac、cysteine 及び *S*-methylcysteine の各付加体の予測プロトン付加分子は、それぞれ m/z 508、364、322 及び 336 であり、予測されるプロダクトイオンとして、*N*-置換体特徴的プロダクトイオンである m/z 244 と *S*-置換体特徴的プロダクトイオンである m/z 235 を観察した。

第二章付属実験

実験材料

酸化型 β -nicotinamide-adenine diphosphate (β -NADP⁺)、sodium D-glucose-6-phosphate 及び glucose-6-phosphate dehydrogenase は、Oriental Yeast Co., Ltd (Tokyo) から購入した。還元型

GSH、glutathione sulfonic acid、1-chloro-3,4-dinitrobenzene (CDNB)、2,3-dichloropyridine、3-amino-2-chloropyridine、2-chloro-3-methylpyridine 及びリン酸カリウムバッファーは、Sigma-Aldrich (St. Louis、MO) から購入した。東京化成工業株式会社 (Tokyo) から、2-chloro-4-nitropyridine 、 2-chloro-5-nitropyridine 、 2-chloro-3-hydroxypyridine 及び 2-chloro-3-trifluoropyridine を購入した。Lancaster (Panorama City、CA) から、2-chloro-3-methoxypyridine ならびに 2-chloro-3-nitropyridine は購入した。塩化マグネシウム及びアセトニトリルは和光純薬工業株式会社 (Osaka) から入手した。Pooled SD rat liver microsomes は XenoTech, LLC (Kansas City、KS) から購入した。

インキュベーション条件

インキュベーション用の反応液は、NADPH-generating system (1 mM β -NADP⁺、1U glucose-6-phosphate dehydrogenase 及び 10 mM sodium D-glucose-6-phosphate) を添加あるいは非添加の条件下、3 mM 塩化マグネシウム、1 mg/mL ラット肝ミクロソーム、及び 5 mM GSH を含む、0.1 M リン酸カリウムバッファー溶液 (pH 7.4) として調製した。インキュベーションは、被検化合物 (最終濃度: 50 μ M) の添加によって開始し、攪拌しながら 37°C で 30 分間行なった。なお、2-chloro-3-nitropyridine (100 μ M) の反応液は、60 分間インキュベーションした。Liver microsomal GST への阻害作用は、競争阻害剤である glutathione sulfonic acid (最終濃度: 20 mM) の添加によって確認した。ニトロ基の置換位置効果は、基質の減少速度 (nmol/min/mg) で評価した。各種官能基の効果は、30 分間のインキュベーションにおける基質の残存率として評価した。酵素反応は、反応液と等量のアセトニトリル/メタノール = 2/1 (v/v) 溶液を添加することにより停止させた。その後、得られた懸濁液は遠心分離 (13800 g、10 分、4°C) し、得られた上清を LC/MS あるいは LC/UV にて分析した。

分析条件

LC/UV 分析システムは、Alliance 2790 Separations Module (Waters) 及び UV detectors (2478 Dual λ Absorbance Detector and Photodiode Array Detector, Waters) で構成した。目的物の分離には、分析カラムとして Cadenza (3 μ m、C18、2 \times 100-mm、Imtakt, Kyoto) を用い、流速 0.3 mL/min で、移動相 A : 0.1% ギ酸水溶液、及び移動相 B : 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液を用いて、グラジエント系にて分離した。グラジエントは、カラムを 5% B で平衡化させた後検体をインジェクションし、95% B に 5 分間で直線的に上昇させ、続いて 95% B を 4 分間維持させる条件で行った。

LC/MS 分析は、LCQ DECA XP Plus ion trap mass spectrometer (Thermo-Fisher Corp., San Jose, CA) を positive ion mode で使用し、クロマトグラフィーの分離システムとして Alliance 2796 Separations Module (Waters) を用いた。マスマススペクトルデータは、質量範囲 m/z 100-1200 Da でのフルスキャンデータならびに MSⁿ スキャンデータを取得した。目的物の分離は、分析カラムとして Cadenza (3 μ m、C18、2 \times 100-mm、Imtakt) を用い、流速 0.2 mL/min で、グラジエント系にて分離した。グラジエントは、カラムを 3% B で平衡化させた後試料をインジェクションし、3% B を 5 分間維持し、その後直線的に 30% B まで 25 分間で上昇させた後、次の 1 分間で 90% B まで上昇させ、そのまま 5 分間 90% B を維持させる条件で行なった。

GSH 付加体である 2-glutathionyl-3-nitropyridine の精密質量分析は、Synapt HDMS/UPLCsystem (Waters) で行い、分析カラムとして Acquity UPLC (1.7 μ m、BEH C18、2.1 \times 50-mm、Waters) を用いた。グラジエントは、流速 0.5 mL/min で行い、10% B でカラムを平衡化させた後試料をインジェクションし、直線的に 50% B まで 5 分間で上昇させ、次の 1 分間で 90% B まで上昇させ、続いて 90% B で 1.5 分間維持させる条件で行った。

分子軌道計算

分子軌道計算は Gaussian 03 を用いて行なった。遷移状態は、F/6-31+G** level of theory を用いて検討し、negative vibrational frequency を用いて確認を行なった。続いて、Intrinsic

Reaction Coordinate (IRC) 計算は、反応物と Meisenheimer complex を関連付ける遷移状態を確認するために行なった。Gibbs free energy は、frequency 計算に従い熱化学的分析から導いた。

第三章付属実験

実験材料

非標識化検体は、万有製薬株式会社（現 MSD 株式会社）つくば研究所（Ibaraki）で合成した。共有結合試験で用いられた放射標識化検体は Merck Research Laboratories（Rahway, NJ）で合成した。L-[³⁵S]Cysteine 塩酸塩（100-150 mCi/mmol）は GE Healthcare（Piscataway, NJ）から入手した。[¹⁴C]Sodium cyanide（53 mCi/mmol）は室町薬品株式会社（Tokyo）から入手した。液体シンチレーションカクテルとして使用した ULTIMA FLO-AP 及び PICO-FLUOR 40 は、PerkinElmer Life And Analytical Science（Norwalk, CT）から購入した。Clozapine、troglitazone、還元型β-nicotinamideadenine dinucleotide phosphate (β-NADPH)、*R*-(+)-pulegone 及びリン酸カリウムバッファーは、Sigma-Aldrich（St. Louis, MO）から入手した。Diclofenac は積水メディカル株式会社（Tokyo）から購入した。塩化マグネシウム、L-cysteine 及び酢酸アンモニウムは和光純薬工業株式会社（Osaka）から入手した。アセトニトリル及びメタノールは純正化学株式会社（Tokyo）から購入した。Pooled human liver microsomes は BD GentestTM（Woburn, MA）から入手した。タンパク質濃度は BCA reagent（Pierce, Rockford, IL）で定量した。使用した水は Millipore A10 Water Purification System（Millipore Corporation, Bedford, MA）で精製したものを用了。

[³⁵S]Cysteine 及び[¹⁴C]cyanide と肝ミクロソームとのインキュベーション条件

非放射標識化検体は、5 mM の 50%アセトニトリル水溶液として調製した。[³⁵S]Cysteine 塩酸塩は、還元剤として 10 mM dithiothreitol (DTT)を含む溶液として購入した。インキュベ

ーション用の反応液は、50 μM 非放射標識化検体、3 mM 塩化マグネシウム及び 1 mg/mL human liver microsomes を含む 0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.4) に、求核試薬として 1 mM L- ^{35}S]cysteine 塩酸塩 (22.7 $\mu\text{Ci}/\text{tube}$) あるいは 0.1 mM ^{14}C]cyanide (0.79 $\mu\text{Ci}/\text{tube}$) を含むように添加し、容量 120 μL として調製した。プレインキュベーションは 37°C で 5 分間行い、反応は 30 μL の 1 mM β -NADPH 水溶液の添加で開始し、インキュベーションを 37°C で 60 分間行なった。陰性コントロール試料として、被検化合物の代わりに 50% アセトニトリル水溶液を添加し、同様にインキュベーションを行なった。酵素反応は、450 μL のアセトニトリルの添加で停止させた。得られた反応性代謝物の付加体は、1 M 酢酸アンモニウム水溶液 (150 μL) を添加しよく攪拌後、遠心分離 (13800 g、5 分、室温) により得られた上清 (アセトニトリル層) を別チューブに移す作業を 2 回行い抽出した。 ^{35}S]Cysteine 付加体が濃縮操作中に生成することを防ぐために、50 mM 非標識化 L-cysteine 水溶液 (150 μL) を抽出作業で得たアセトニトリル溶液に添加し、窒素ガス気下濃縮した。得られた残渣は 40% メタノール水溶液 40 μL に再溶解し、radio-LC(/MS) 分析に供した。なお、反応液中に添加した ^{35}S]cysteine と ^{14}C]cyanide の最終濃度 (それぞれ 1 及び 0.1 mM) は、60 分間のインキュベーションで代謝反応を阻害しない濃度として設定した。

In Vitro 共有結合試験

放射標識化検体を用いた共有結合試験は、Day らの方法に従い、NADPH を添加したヒト肝ミクロソームで行い、タンパク質中に残存した放射活性を測定することで共有結合量を算出した⁴⁴⁾。インキュベーション用の反応液は、10 μM の放射標識化検体、1 mg-protein/mL のヒト肝ミクロソーム及び 1 mM NADPH を含む 200 μL の 0.1 M リン酸カリウムバッファー (pH 7.4) 溶液として調製した (n=3)。インキュベーションは 37°C で 60 分間行い、代謝反応の停止は 800 μL のアセトン添加によって行った。得られた懸濁液は、Brandel cell/membrane harvester (Brandel, Gaithersburg, MD) に供し、タンパク質を採取すると同時に 80% メタノール水溶液によって洗浄し、採取したタンパク質と共有結合していない放射

標識体を除いた。タンパク質を採取した際のフィルターは液体シンチレーションバイアルにパンチアウトし、フィルター上に得られたタンパク質を溶解するために 7.5% SDS 溶液 (150 μ L) を添加し、55°C で一晩攪拌した。溶解されたタンパク質溶液の一部は、BCA reagent (Pierce) によるタンパク質定量に供した。液体シンチレーションバイアルに 5 mL の PICO-FLUOR 40 を添加し、放射活性を液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 3100TR、PerkinElmer Life and Analytical Science、Norwalk、CT) にて測定した。得られた値から、共有結合量を 1 mg タンパク質に対して結合した検体量 (pmol drug equivalent/mg protein) として算出した。

Radio-LC/MS 分析条件

HPLC-radiochromatography システムは、Agilent 1100 HPLC system (バイナリーポンプ、オートサンプラー、カラムオーブン、UV 検出器、Agilent Technology、Palo Alto、CA) と 500- μ L の液体シンチレーションセルを搭載した on-line radioisotope detector (500TR series、PerkinElmer Life And Analytical Science、Norwalk、CT) で構成した。クロマトグラフィーは、分析カラムとして Symmetry Shield RP18 (5 μ m、4.6 \times 250 mm、Waters)、ガードカラムとして Symmetry Shield RP18 (5 μ m、3.9 \times 20 mm、Waters) を用いて行なった。移動相は、移動相 A : 100 mM 酢酸アンモニウム水溶液/水/アセトニトリル=10/85/5 (v/v/v) 及び移動相 B : 100 mM 酢酸アンモニウム水溶液/アセトニトリル=1/9 (v/v) を用い、流速 1 mL/min で 75 分間の測定を行なった。グラジエント条件は、100% A でカラムを平衡化させた後試料をインジェクションし、100% A を 10 分間維持し、その後 30 分間かけて直線的に 29.4% B まで上昇させ、さらに次の 20 分間で 100% B まで上昇させた、最後に 100% B で 15 分間維持させる条件で行った。高濃度の放射標識体による Radioisotope detector の汚染を防ぐために、インジェクション後の最初の 6.5 分間の分析カラムからの溶出液はバルブ (GL Science、Tokyo) を用いて除去し、未反応の [³⁵S]cysteine あるいは [¹⁴C]cyanide が radioisotope detector へ導入されないようにした。液体シンチレーションカクテル (ULTIMA FLO-AP) は、流速

2 mL/min で分析カラムからの溶出液と混和した。放射活性測定においては、 ^{35}S と ^{14}C の β 線エネルギーがほとんど同等なため (各 156 及び 167 KeV)、 ^{35}S cysteine あるいは ^{14}C cyanide の付加体の検出には、 ^{35}S の放射活性を測定した。

マスペクトルの測定は、先に記載した HPLC-radiochromatography システムに LCQ DECA XP Plus ion trap mass spectrometer (Thermo-Finnigan Corp., San Jose, CA) を接続して行い、positive ion mode で測定した。MS のイオンソースの設定は、Spray voltage : 5 kV、Ion transfer tube temperature : 250°C、Sheath gas の流速 : 70 ユニット及び Auxiliary gas の流速 : 10 ユニットとした。また、Collision-induced dissociation (CID) は 45% に設定した。イオンスプレー電圧、キャピラリー電圧及びチューブレズオフセットは、最大の感度を得られるように最適化した。マスペクトルは、 m/z 100-1200 Da の質量範囲で取得し、構造解析するために MSⁿ 測定を適宜行なった。クロマトグラフィーは、分析カラムとして Atlantis dC18 (5 μm , 4.6 \times 250 mm, Waters)、ガードカラムとして Atlantis dC18 (5 μm , 3.9 \times 20 mm, Waters) を用いて行った。移動相は、移動相 C : 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液及び移動相 D : 10 mM 酢酸アンモニウムを含む 90% アセトニトリル水溶液を用い、流速 1 mL/min で 60 分間の測定を行なった。グラジエントは、カラムを 90% C で平衡化させた後試料をインジェクションし、90% C で最初の 10 分間維持した後、直線的に 30% D まで 30 分間で上昇させ、さらに次の 15 分間で 100% D まで直線的に上昇させ、その後 100% D で 5 分間維持させる条件で行った。分析カラムからの溶出液は、1 : 4 の容量比でそれぞれマスペクトロメーターと radioisotope detector に導入した。液体シンチレーションカクテルは ULTIMA FLO-AP を用い、流速 1.6 mL/min で HPLC からの溶出液と混和した。放射活性は、前述の通り ^{35}S の放射活性を観察した。

データ処理

ラジオクロマトグラム上認められたすべてのピークのエリアを合算し、この値を共有結合試験で得られた値と比較した。

引用文献

1. Guidance for Industry Safety Testing of Drug Metabolites (2008) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
2. 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施について のガイダンス (ICH Consensus Guideline).
3. Walgren JL, Mitchell MD, and Thompson DC (2005) Role of Metabolism in Drug-Induced Idiosyncratic Hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 35: 325-361.
4. Guidance for Industry Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations (2012) U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
5. Naisbitt DJ and Uetrecht J (2013) Idiosyncratic Adverse Drug Reactions: Current Concepts. *Pharmacol Rev* 65: 779-808.
6. Bloemen LJ, Monster AC, Kezic S, Commandeur JNM, Veulemans H, Vermeulen NPE, and Wilmer JW (2001) Study on the cytochrome P-450- and glutathione-dependent biotransformation of trichloroethylene in humans. *Int Arch Occup Environ Health* 74: 102-108.
7. Commandeur JNM, Stijntjes GJ, and Vermeulen NPE (1995) Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol Rev* 47: 271-330.
8. Fitch WL, Berry PW, Tu Y, Tabatabaei A, Lowrie L, Lopez-Tapia F, Liu Y, Nitzan D, Masjedizadeh MR, and Varadarajan A (2004) Identification of glutathione-derived metabolites from an IP receptor antagonist. *Drug Metab Dispos* 32: 1482-1490.
9. Grillo MP, Hua F, March KL, Benet LZ, Knutson CG, and Ware JA (2008)

- γ -Glutamyltranspeptidase-mediated degradation of diclofenac-S-acyl-glutathione in vitro and in vivo in rat. *Chem Res Toxicol* 21: 1933-1938.
10. Hinchman CA and Ballatori N (1990) Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species. *Biochem Pharm* 40: 1131-1135.
 11. Ikuta K, Yano S, Trung VT, Hanibuchi M, Goto H, Li Q, Wang W, Yamada T, Ogino H, Kakiuchi S, Uehara H, Sekido Y, Uenaka T, Nishioka Y, and Sone S (2009) E7080, a multi-tyrosine kinase inhibitor, suppresses the progression of malignant pleural mesothelioma with different proangiogenic cytokine production profiles. *Clin Cancer Res* 15: 7229-7237.
 12. Lertratanangkoon K, Horning MG, Middleditch BS, Tsang WS, and Griffin GW (1982) Urinary bivalent sulfur metabolites of phenanthrene excreted by the rat and guinea pig. *Drug Metab Dispos* 10: 614-623.
 13. Matsui J, Yamamoto Y, Funahashi Y, Tsuruoka A, Watanabe T, Wakabayashi T, Uenaka T, and Asada M (2008a) E7080, a novel inhibitor that targets multiple kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. *Int J Cancer* 122: 664-671.
 14. Matsui J, Funahashi Y, Uenaka T, Watanabe T, Tsuruoka A, and Asada M (2008b) Multi-kinase inhibitor E7080 suppresses lymph node and lung metastases of human mammary breast tumor MDA-MB-231 via inhibition of vascular endothelial growth factor-receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 kinase. *Clin Cancer Res* 14: 5459-5465.
 15. Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung VT, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, and Sone S (2011) E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. *Mol Cancer Ther* 10: 1218-1228.
 16. Richardson KA, Peters MMCG, Megens RHJJ, Elburg PA, Golding BT, Boogaard PJ, Watson WP, and Sittert NJ (1998) Identification of novel metabolites of butadiene monoepoxide in rats and mice. *Chem Res Toxicol* 11: 1543-1555.

17. Stillwell WG, Horning MG, Griffin GW, and Tsang WS (1982) Identification of new sulfur-containing metabolites of naphthalene in mouse urine. *Drug Metab Dispos* 10: 624-631.
18. Tate SS (1975) Interaction of γ -glutamyl transpeptidase with *S*-acyl derivatives of glutathione. *FEBS Lett* 54: 319-322.
19. Teffera Y, Colletti AE, Harmange JC, Hollis LS, Albrecht BK, Boezio AA, Liu J, and Zhao Z (2008) Chemical reactivity of methoxy 4-*O*-aryl quinolines: Identification of glutathione displacement products in vitro and in vivo. *Chem Res Toxicol* 21: 2216-2222.
20. Armstrong RN (1991) Glutathione *S*-transferases: Reaction mechanism, structure, and function. *Chem Res Toxicol* 4:131-140.
21. Armstrong RN (1997) Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 10:2-18.
22. Bowden K, Prasannan S, and Ranson RJ (1987) Reactions in strongly basic media. Part 7, correlation of the rates of alkaline hydrolysis of 2-substituted 3- and 5-nitropyridines, 4-nitropyridine *N*-oxide, and 2- and 4-substituted pyridine methiodides in aqueous dimethylsulphoxide with and acidity function. *J Chem Soc Perkin Trans II*: 181-184.
23. Chen H, Chen H and Cooks RG (2004) Meisenheimer complexes bonded at carbon and at oxygen. *J Am Soc Mass Spectrom* 15:998-1004.
24. Clark AG and Sinclair M (1988) The Meisenheimer complex of glutathione and trinitrobenzene. *Biochem Biopharmac* 37:259-263.
25. Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974) Glutathione *S*-transferases. *J Biol Chem* 249:7130-7139.
26. Keen JH, Habig WH and Jakoby WB (1976) Mechanism for the several activities of the glutathione *S*-transferases. *J Biol Chem* 251:6183-6188.

27. Morgenstern R, Lundqvist G, Hancock V and DePierre JW (1988) Studies on the activity and activation of rat liver microsomal glutathione transferase, in particular with a substrate analogue series. *J Biol Chem* 14:6671-6675.
28. Morgenstern R, Sevensson R, Bernat BA, and Armstrong RN (2001) Kinetic analysis of the slow ionization of glutathione by microsomal glutathione transferase MGST1. *Biochemistry* 40:3378-3384.
29. Patskovsky Y, Patskovska L, Almo SC and Listowsky I (2006) Transition state model and mechanism of nucleophilic aromatic substitution reactions catalyzed by human glutathione S-transferase M1a-1a. *Biochemistry* 45:3852-3862.
30. Rietjens IMCM, Soffers AEMF, Hooiveld GJEJ, Veeger C and Vervoort J (1995) Quantitative structure-activity relationships based on computer calculated parameters for the overall rate of glutathione-S-transferase catalyzed conjugation of a series of fluoronitrobenzenes. *Chem Res Toxicol* 8:481-488.
31. Sun T-H and Morgenstern R (1997) Binding of glutathione and an inhibitor to microsomal glutathione transferase. *Biochem J* 326:193-196.
32. van der Aar EM, de Groot MJ, Bijloo GJ, van der Goot H, and Vermeulen NP (1996) Structure-activity relationships for the glutathione conjugation of 2-substituted 1-chloro-4-nitrobenzenes by rat glutathione S-transferase 4-4. *Chem Res Toxicol* 9: 527-534.
33. van der Aar EM, de Groot MJ, Bouwman T, Bijloo GJ, Commandeur JN, and Vermeulen NP (1997) 4-Substituted 1-chloro-2-nitrobenzenes: structure-activity relationships and extension of the substrate model of rat glutathione S-transferase 4-4. *Chem Res Toxicol* 10: 439-449.
34. Liebler DC, and Guengerich FP (2005) Elucidating mechanisms of drug-induced toxicity. *Nat Rev Drug Disc* 4: 410-420.
35. Walgren JL, Mitchell MD, and Thompson DC (2005) Role of metabolism in drug-induced

- idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 35: 325-361.
36. Baillie TA (2006) Future of toxicology-metabolic activation and drug design: Challenges and opportunities in chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 19: 889-893.
37. Evans DC, and Baillie TA (2005) Minimizing the potential for metabolic activation as an integral part of drug design. *Curr Opin Drug Dis Develop* 8: 44-50.
38. Amacher DE (2006) Reactive intermediates and the pathogenesis of adverse drug reactions: The toxicology perspective. *Curr Drug Metab* 7: 219-229.
39. Pearson RG (1963) Hard and soft acids and bases. *J Am Chem Soc* 85: 3533-3539.
40. Doss GA, and Baillie TA (2006) Addressing metabolic activation as an integral component of drug design. *Drug Metab Rev* 38: 641-649.
41. Tang W (2007) Drug metabolite profiling and elucidation of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3: 407-420.
42. Caldwell GW, and Yan Z (2006) Screening for reactive intermediates and toxicity assessment in drug. *Curr Opin Drug Dis Develop* 9: 47-60.
43. Uetrecht J (2003) Screening for the potential of a drug candidate to cause idiosyncratic drug reactions. *Drug Dis Today*, 8, 832-837.
44. Day SH, White R, Schulz-Utermoehl T, Miller R, and Beconi MG (2005) A semi-automated method for measuring the potential for protein covalent binding in drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods* 52: 278-285.
45. Evans DC, Watt A P, Nicoll-Griffith D A, and Baillie TA (2004) Drug-Protein Adducts: An Industry Perspective on Minimizing the Potential for Drug Bioactivation in Drug Discovery and Development. *Chem Res Toxicol* 17: 3-16.

46. Gan J, Harper T W, Hsueh M, Qu Q, and Humphreys WG (2005) Dansyl glutathione as a trapping agent for the quantitative estimation and identification of reactive metabolites. *Chem Res Toxicol* 18: 896-903.
47. Masubuchi N, Makino C, and Murayama N (2007) Prediction of in vivo potential for metabolic activation of drugs into chemically reactive intermediates: Correlation of in vitro and in vivo generation of reactive intermediates and in vitro glutathione conjugate formation in rats and human. *Chem Res Toxicol* 20: 455-464.
48. Liu ZC, and Uetrecht JP (1995) Clozapine is oxidized by activated human neutrophils to a reactive nitrenium ion that irreversibly binds to the cells. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 1476-1483.
49. Boelsterli UA (2008) Diclofenac-induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 192: 307-322.
50. Tetley JN, Maggs JL, Rapeport WG, Pirmohamed M, and Park BK (2001) Enzyme-induction dependent bioactivation of troglitazone and troglitazone quinone in vivo. *Chem Res Toxicol* 14: 965-974.
51. He K, Talaat RE, Pool WF, Reily MD, Reed JE, Bridges AJ, and Woolf TF (2004) Metabolic activation of troglitazone: identification of a reactive metabolite and mechanisms involved. *Drug Metab Dispos* 32: 639-646.
52. Williams DP, Pirmohamed M, Naisbitt DJ, Maggs JL, and Park BK (1997) Neutrophil cytotoxicity of the chemically reactive metabolite(s) of clozapine: Possible role in agranulocytosis. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1375-1382.
53. Zheng J, Ma L, Xin B, Olah T, Humphreys WG, and Zhu M (2007) Screening and identification of GSH-trapped reactive metabolites using hybrid triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 20: 757-766.
54. Tang W, Stearns RA., Wang RW, Chiu SL, and Baillie TA (1999) Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: Identification of

- glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab Dispos* 27: 365-372.
55. Maggs JL, Williams D, Pirmohamed M, and Park BK (1995) The metabolic formation of reactive intermediates from clozapine, a drug associated with agranulocytosis in man. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 1463-1475.
 56. Madyastha KM, and Moorthy B (1989) Pulegone mediated hepatotoxicity: Evidence for covalent binding of R-(+)-[¹⁴C]pulegone to microsomal proteins in vitro. *Chem Biol Interact* 72: 325-333.
 57. Thomassen D, Slattery JT, and Nelson SD (1990) Menthofuran-dependent and independent aspects of pulegone hepatotoxicity: Role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 567-572.
 58. Meneses-Lorente G, Sakatis MZ, Schulz-Utermoehl T, De Nardi C, and Watt AP (2006) A quantitative high-throughput trapping assay as a measurement of potential for bioactivation. *Anal Biochem* 351: 266-272.
 59. Argoti D, Liang L, Conteh A, Chen L, Bershas D, Yu C, Vouros P, and Yang E (2005) Cyanide trapping of iminium ion reactive intermediates followed by detection and structure identification using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Chem Res Toxicol* 18:1537-1544.
 60. Murphy PJ (1973) Enzymatic oxidation of nicotine to nicotine $\Delta^{1(5)}$ iminium ion. *J Biol Chem* 248: 2796-2800.
 61. Gorrod JW, and Aislaitner G (1994) The mechanism of alicyclic amines to reactive iminium ion intermediates. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 19: 209-217.
 62. Gorrod JW, Whittlesea CMC, and Lam SP (1991) Trapping of reactive intermediates by incorporation of ¹⁴C-sodium Cyanide during microsomal oxidation. *Adv Exp Med Biol* 283: 657-664.
 63. Zhang Z, Chen Q, Li Y, Doss GA, Dean BJ, Ngui JS, Elipe MS, Kim S, Wu JY, DiNinno F, Hammond ML, Stearns RA, Evans DC, Baillie TA, and Tang W (2005) In vitro bioactivation of

- dihydrobenzoxathiin selective estrogen receptor modulators by cytochrome P450 3A4 in human liver microsomes: formation of reactive iminium and quinone type metabolites. *Chem Res Toxicol* 18: 675-685.
64. Kassahun K, Pearson PG, Tang W, McIntosh I, Leung K, Elmore C, Dean D, Wang R, Doss G, and Baillie TA (2001) Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates in vitro and in vivo. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission. *Chem Res Toxicol* 14: 62-70.
 65. Kalgutkar AS, Dalvie DK, Aubrecht J, Smith EB, Coffing SL, Cheung JR, Vage C, Lame ME, Chiang P, McClure KF, Maurer TS, Coelho RVJr., Oliman VF, and Childknegt K (2007) Genotoxicity of 2-(3-chlorobenzyloxy)-6-(piperazinyl)pyrazine, a novel 5-hydroxytryptamine_{2c} receptor agonist for the treatment of obesity: role of metabolic activation. *Drug Metab Dispos* 35: 848-858.
 66. Silverman RB *Mechanism-based Enzyme Inactivation: Chemistry and Enzymology*. CRC press, Boca Raton, FL Vols I and II, 1988, pp. 3-16.
 67. Anni H, Pristatsky P, and Israel Y (2003) Binding of acetaldehyde to a glutathione metabolite: Mass spectrometric characterization of an acetaldehyde-cysteinylglycine conjugate. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1613-1621.
 68. Ratner S, and Clarke HT (1937) The action of formaldehyde upon cysteine. *J Am Chem Soc* 59, 200-206.